

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

EMILY MASSAHUD CARVALHO RIBEIRO

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE FILMES DE POLIURETANO
PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CURATIVOS

BELO HORIZONTE

2018

EMILY MASSAHUD CARVALHO RIBEIRO

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE FILMES DE POLIURETANO
PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CURATIVOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Coorientadora: Dra. Fernanda Costal Oliveira

BELO HORIZONTE

2018

EMILY MASSAHUD CARVALHO RIBEIRO

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE FILMES DE POLIURETANO
PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO CURATIVOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Dra. Fernanda Costal Oliveira

Profa. Dra. Aline Bruna Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por todas as oportunidades e caminhos que me trouxeram até aqui.

À minha família pelo apoio, compreensão, paciência e amor, em especial à minha avó Nádia Massahud de Carvalho, por sempre me apoiar e acreditar na minha capacidade e sucesso, e me ajudar a trilhar estes caminhos desde quando posso me lembrar.

Ao meu namorado, Rhenan Freira Ferreira Folco, pelo amor, atenção, paciência, cumplicidade, por ser meu melhor amigo e companheiro, mesmo de longe, e pelo apoio constante em todos os momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo, por ser um dos meus maiores exemplos acadêmicos; pelos ensinamentos, orientação, apoio, paciência e incentivo durante não somente a trajetória deste trabalho, mas como professora, ao longo de uma grande parte do Curso de Engenharia de Materiais.

À minha coorientadora Dra. Fernanda Costal Oliveira, pelos ensinamentos, orientação, colaboração, disponibilidade para me ajudar, e auxiliar na realização de experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Delfín Chavéz Olórtegui, pela colaboração e parceria para plena utilização do laboratório de Imunoquímica de Proteínas, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

À mestrandia Letícia Lopes de Souza, por todo o auxílio na realização de experimentos, por ser sempre tão solícita a ensinar e ajudar, sempre com um sorriso no rosto.

À Dra. Stephanie Stransky Láuar, por todos os ensinamentos, orientação, incentivos, paciência e auxílio na realização de experimentos.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, em especial ao Dr. Márcio Tadeu Pereira, pelo apoio e parceria na irradiação das amostras.

Ao Prof. Carlos Eduardo dos Santos, por toda contribuição acadêmica, pelo apoio na confecção do dispositivo de corte utilizado nesse trabalho, sendo sempre muito solícito e simpático.

À Profa. Dra. Elaine Carballo Siqueira Corrêa, por todos os ensinamentos durante o curso, por ser a professora mais Fofa do CEFET, e pelo auxílio na realização de tratamentos térmicos para o presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Joel Lima e equipe do laboratório de Fundição do CEFET-MG, pelos ensinamentos e auxílio na realização de processamentos em materiais metálicos.

À bolsista Wânia Soares de Oliveira pela realização dos ensaios com microrganismos no CEFET-MG.

À bolsista Fernanda Vieira de Sá, por toda a colaboração durante o curso deste trabalho.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, pela oportunidade, por todos os amigos que me presenteou, pelos momentos bons, e o amadurecimento durante todos esses anos.

A todos os professores do CEFET-MG que contribuíram com meus conhecimentos acadêmicos, durante o curso da minha graduação.

Aos colegas e amigos do Labimq da UFMG, por todos os ensinamentos, companheirismo e auxílio da realização de experimentos.

A todos que tornaram esse trabalho possível, direta ou indiretamente, e que de alguma forma estiveram presentes durante essa trajetória.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

“Quando tudo parecer ir contra você, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele.”

(Henry Ford)

RESUMO

Lesões de pele causadas por acidentes, queimaduras, traumas e feridas crônicas são atualmente consideradas um grave problema na área médica. Em virtude disso, existe uma demanda crescente por biomateriais apropriados para tratar e auxiliar na reparação de lesões de pele. Curativos são tratamentos amplamente utilizados no tratamento de feridas, pois proporcionam um ambiente adequado ao processo de cicatrização. Devido às propriedades físico-químicas necessárias à aplicação, materiais poliméricos são os mais utilizados como curativos. No presente trabalho, foram produzidos, a partir da técnica de evaporação de solvente, filmes de poliuretano sem óleo de copaíba (PU₀) e com 30 % m/m de óleo de copaíba (PU_{óleo}), um conhecido extrato natural, com propriedades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais e analgésicas. Os filmes foram esterilizados com diferentes doses de irradiação gama, e após análise da superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura e avaliação da esterilidade por ensaio microbiológico, foram escolhidas as doses de 15 e 10 KGy para os filmes de PU₀ e PU_{óleo}, respectivamente. Em seguida, foram realizados ensaios de viabilidade celular com uma linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) e avaliação quantitativa a partir do teste de Alamar Blue. Células HaCaT em contato por 24 horas com filmes PU₀ aderiram à superfície do filme e apresentaram viabilidade celular de 95,22% (\pm 2,40); não sendo observada diferença significativa quando comparado com o grupo controle ($p = 0,91$). Já no ensaio de contato direto, a viabilidade das células HaCaT em contato por 24 horas com filmes PU₀ foi de 90,78% (\pm 7,88); e novamente não foi observada diferença significativa quando comparado com o grupo controle ($p = 0,19$). Deste modo, ensaios *in vitro* com a linhagem de células HaCaT indicam a citocompatibilidade dos filmes de PU₀. Um teste preliminar com filmes PU_{óleo} indica que este material também apresenta citocompatibilidade com células HaCaT, sugerindo que o emprego do óleo de copaíba em filmes de poliuretano é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de curativos para tratamento de feridas.

Palavras Chave: Poliuretano, Óleo de copaíba, Curativo, Viabilidade celular, células HaCaT.

ABSTRACT

Skin lesions caused by accidents, burns, trauma and chronic wounds are currently considered a serious problem in the medical field. Therefore, there is a growing demand for suitable biomaterials to treat and assist in the repair of skin injuries. Wound dressings are treatments widely used in the treatment of skin lesions, as they provide an adequate environment for the healing process. Due to the physicochemical properties required for their application, polymeric materials are the class of materials most used as wound dressings. In the present work, polyurethane films without copaiba oil (PU₀) and with 30% w/w copaiba oil (PU_{óleo}), a known natural extract, with antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, antitumor and analgesic properties, were produced by the solvent casting technique. The films were sterilized with different doses of gamma irradiation, and after surface analysis by Scanning Electron Microscopy and sterility evaluation performed by microbiological test, the doses of 15 and 10 KGy were chosen for the PU₀ and PU_{óleo} films, respectively. Cell viability assays were then performed with a human keratinocyte line (HaCaT) and quantitative evaluation was measured by Alamar Blue assay. HaCaT cells in contact with PU₀ films for 24 hours adhered to the film surface and presented cellular viability of 95.22% (\pm 2.40); and no significant difference was observed when compared to the control group ($p = 0.91$). In the direct contact assay, the viability of HaCaT cells in contact for 24 hours with PU₀ films was 90.78% (\pm 7.88); and again, no significant difference was observed when compared to the control group ($p = 0.19$). Thus, *in vitro* assays with the HaCaT cell line indicate cytocompatibility of PU₀ films. A preliminary test with PU₀ films indicates that this material also exhibits cytocompatibility with HaCaT cells, suggesting that the use of copaiba oil in polyurethane films is a promising strategy for the development of wound dressings.

Keywords: Polyurethane, Copaiba Oil, Wound Dressing, Cell viability, HaCaT cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação esquemática das camadas da pele e hipoderme humana. | 19 |
| Figura 2 - Desenho esquemático dos principais eventos relacionados à inflamação. | 23 |
| Figura 3 – Polimerização em etapas para síntese de poliuretanos. | 30 |
| Figura 4 – Estruturas químicas de diisocianatos comumente utilizados para a síntese de poliuretanos. | 31 |
| Figura 5 – Principais componentes do óleo de copaíba e a inibição contra diferentes bactérias e fungos | 38 |
| Figura 6 – Esquema das principais espécies de copaíba e dos microrganismos inibidos | 39 |
| Figura 7 - Queratinócitos humanos normais da pele e primeiras passagens das células HaCaT | 42 |
| Figura 8 – Reação de redução da resazurina à resorufina. | 44 |
| Figura 9 – Fluxograma do procedimento experimental adotado. | 47 |
| Figura 10 – Esquema de processamento por evaporação de solvente. | 48 |
| Figura 11 - Desenho esquemático da posição das amostras na placa de 24 poços. | 52 |
| Figura 12 - Desenho esquemático da posição das amostras na placa de 6 poços. | 53 |
| Figura 13 – Filmes de PU sem e com óleo de copaíba | 55 |
| Figura 14 – Aparência do dispositivo de corte de diâmetro 15 mm após tratamento térmico e diferentes processamentos para limpeza superficial. | 57 |
| Figura 15 – Aparência do dispositivo de corte de diâmetro 15 mm após lixamento com auxílio de torno mecânico. | 58 |
| Figura 16 - Dispositivo de corte de diâmetro 10 mm confeccionado. | 59 |
| Figura 17 – Filmes de PU cortados em diâmetros de 10 e 15 mm. | 59 |
| Figura 18 – Filmes de PU₀ irradiados e não irradiado após 24 h | 60 |
| Figura 19 – Filmes de PU₀ irradiados e não irradiado após 48 h | 61 |
| Figura 20 – Filmes de PU₀ irradiados e não irradiado após 72 h | 61 |
| Figura 21 – Filme de PU₀ não irradiado. | 62 |
| Figura 22 – Filme de PU₀ irradiado com 10 KGy. | 64 |
| Figura 23 – Filme de PU₀ irradiado com 15 KGy. | 65 |
| Figura 24 – Filme de PU₀ irradiado com 20 KGy. | 66 |
| Figura 25 – Filme de PU_{óleo} não irradiado. | 68 |
| Figura 26 – Filme de PU_{óleo} irradiado com 10 KGy. | 69 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 27 – Filme de PU_{óleo} irradiado com 15 KGy. | 70 |
| Figura 28 - Placa de 24 poços após incubação por 3h com reagente Alamar Blue. | 72 |
| Figura 29 - Viabilidade de células HaCaT em placas de 24 poços..... | 73 |
| Figura 30 – Microscopia óptica de células HaCaT em placas de 24 poços. | 74 |
| Figura 31 - Placa de 6 poços após incubação por 3h com reagente Alamar Blue. | 75 |
| Figura 32 - Viabilidade de células HaCaT em placas de 6 poços..... | 76 |
| Figura 33 - Microscopia óptica de células HaCaT em placas de 6 poços. | 77 |
| Figura 34 - Viabilidade de células HaCaT em contato direto com PU_{óleo}. | 78 |
| Figura 35 – Ensaio de disco-difusão do óleo de copaíba em ágar | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Principais curativos de poliuretano produzidos e comercializados pela Curatec | 34 |
| Tabela 2 – Principais curativos de poliuretano produzidos e comercializados pela Hartmann | 35 |
| Tabela 3 – Principais propriedades do poliuretano DELTHANE® E85. | 36 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 3.1 PELE..... | 18 |
| 3.1.1. <i>Epiderme</i> | 19 |
| 3.1.2. <i>Derme</i> | 20 |
| 3.2. FERIDAS DE PELE | 21 |
| 3.2.1. <i>Características das feridas</i> | 21 |
| 3.3. REPARAÇÃO DE FERIDAS | 22 |
| 3.4. TRATAMENTO DE FERIDAS | 24 |
| 3.5. CURATIVOS POLIMÉRICOS | 26 |
| 3.5.1. <i>Filmes poliméricos como curativos</i> | 27 |
| 3.6. POLIURETANOS | 29 |
| 3.7. ÓLEO DE COPAÍBA | 36 |
| 3.8. LINHAGEM HACAT | 40 |
| 3.9. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR | 43 |
| 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 46 |
| 4.1. MATERIAIS..... | 46 |
| 4.2. MÉTODOS | 47 |
| 4.3. PRODUÇÃO DOS FILMES DE PU | 48 |
| 4.3.1. <i>Filmes de PU sem Óleo de Copaíba</i> | 48 |
| 4.3.2. <i>Filmes de PU com Óleo de Copaíba</i> | 48 |
| 4.4. FABRICAÇÃO DE UM DISPOSITIVO PARA CORTE DOS FILMES DE PU | 49 |
| 4.5. ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES DE PU..... | 49 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.6. | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES | 50 |
| 4.6.1. | <i>Teste microbiológico para avaliação da esterilidade dos filmes de PU</i> | 50 |
| 4.6.2. | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> | 50 |
| 4.7. | ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR | 50 |
| 4.7.1. | <i>Manutenção das Células em Cultura</i> | 50 |
| 4.7.2. | <i>Avaliação da viabilidade celular</i> | 51 |
| 4.8. | ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR | 54 |
| 4.9. | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 54 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 5.2. | FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS PARA CORTE DOS FILMES DE PU | 56 |
| 5.3. | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES | 59 |
| 5.3.1. | <i>Teste microbiológico para avaliação da esterilidade dos filmes de PU₀</i> | 60 |
| 5.3.2. | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> | 62 |
| 5.4. | ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR | 71 |
| 5.5. | ENSAIOS DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR | 79 |
| 6. | CONCLUSÃO | 82 |
| 7. | PERSPECTIVAS | 83 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e se caracteriza como um sistema complexo, que realiza o revestimento externo do corpo, recobrando toda sua superfície (VENUS *et al.*, 2011; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Por estar em contato com o ambiente externo, a pele está sujeita a uma maior incidência de traumas e lesões. Quando a pele é lesionada, suas funções básicas de proteção são comprometidas. As lesões de pele podem ocorrer por fatores extrínsecos, como incisão cirúrgica ou trauma, e fatores intrínsecos, a partir de um processo inflamatório (ECHER *et al.*, 2010). Lesões de pele causadas por acidentes, queimaduras, traumas e feridas crônicas se configuram como um grave problema na área médica. Estima-se que aproximadamente 20% dos pacientes diabéticos são propensos a desenvolver feridas crônicas nos pés. Adicionalmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 300 mil mortes ocorrem anualmente como resultado de queimaduras resultantes de incêndios (CAPANEMA *et al.*, 2017).

A reparação de feridas tem por objetivo imediato a restauração da integridade tecidual e é caracterizada como um processo biológico dinâmico, que envolve interações complexas entre componentes celulares. Dependendo da extensão da lesão, o processo de reparação tecidual pode ser feito normalmente pelo próprio organismo; entretanto, fatores como idade avançada, deficiências nutricionais, problemas de vascularização e mobilidade reduzida, são aspectos que tem potencial para retardar o processo de reparação tecidual da pele, levando à diversas complicações da enfermidade. Desta forma, existe uma demanda crescente por tratamentos apropriados para auxiliar a reparação de lesões de pele (CAPANEMA *et al.*, 2017).

Curativos são amplamente utilizados no tratamento de feridas, pois proporcionam um ambiente adequado ao processo de cicatrização. Durante o processo de reparação tecidual, os principais papéis de um curativo incluem proteger a ferida contra traumas mecânicos; manter a umidade na lesão, de modo a facilitar a migração celular, bem como diminuir a nocicepção; promover a remoção/contenção do excesso de exsudato; promover isolamento térmico, maximizando o metabolismo celular; permitir a realização de trocas gasosas da ferida com o meio externo; e minimizar a formação de tecido cicatricial. É ainda requerido que o curativo seja impermeável à entrada de microrganismos, seja biocompatível, confortável e maleável (VOWDEN *et al.*, 2017). Devido às propriedades físico-químicas necessárias a essa aplicação, materiais poliméricos são amplamente utilizados como curativos.

Atualmente, os curativos poliméricos existem sob a forma de espumas, hidrogéis, alginatos, hidrocoloides e filmes (KAMOUN *et al.*, 2017). Além disso, área de Engenharia de Materiais tem desenvolvido curativos a partir de diversos materiais poliméricos, como fibroína de seda, queratina, quitosana (GANESAN, 2017), carboximetilcelulose (VINKLÁRKOVÁ *et al.*, 2017), poli (óxido de etileno) (BOATENG *et al.*, 2013), alginato de sódio (LI *et al.*, 2017), etc. Em inúmeros trabalhos, percebe-se uma forte tendência pela busca de filmes poliméricos para aplicação como curativos, aos quais são adicionadas diferentes substâncias para agir como agentes antimicrobianos, analgésicos ou anti-inflamatórios. Estas estratégias são desenvolvidas para propiciar a reparação do tecido lesado o mais rapidamente possível, visando melhoria na qualidade de vida de indivíduos acometidos por feridas agudas ou crônicas.

A utilização de polímeros sintéticos tem como grande vantagem a possibilidade de projetar sua estrutura química, de forma a obter-se propriedades requeridas à aplicação, bem como controle de degradação. Estes materiais podem ser processados em diversos formatos e porosidades, e serem funcionalizados com diferentes biomoléculas (CHIONO *et al.*, 2017). Dentre os polímeros sintéticos, os poliuretanos são amplamente utilizados como biomateriais. Sua estrutura propicia a esses materiais uma vasta gama de propriedades físico-químicas, dependendo da composição (CHIONO *et al.*, 2017). Diversos tipos de curativos de poliuretano já são utilizados na clínica, devido à sua transparência, permeabilidade a troca de gases, e atuação como barreira à infecção por microrganismos. A incorporação do óleo de copaíba, um conhecido extrato natural, com propriedades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais e analgésicas (CASCON & GILLBERT, 2000; VEIGA JR. *et al.*, 2001), a este material, se mostra uma promissora alternativa para aplicação na área de tratamento de lesões de pele.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades biológicas de filmes de poliuretano produzidos pela técnica de evaporação de solvente, com e sem óleo de copaíba, a partir de ensaios *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir filmes de poliuretano, a partir da técnica de evaporação de solvente, com e sem óleo de copaíba;
- Avaliar a eficácia da esterilização de filmes de poliuretano com diferentes intensidades de irradiação gama;
- Investigar o efeito da radiação gama na superfície de filmes de poliuretano, com e sem óleo de copaíba, a partir de análise de superfície, utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Avaliar o potencial citotóxico dos filmes de poliuretano, com e sem óleo de copaíba, a partir de testes *in vitro* utilizando a linhagem de células de queratinócitos HaCaT;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba a partir do ensaio de disco difusão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PELE

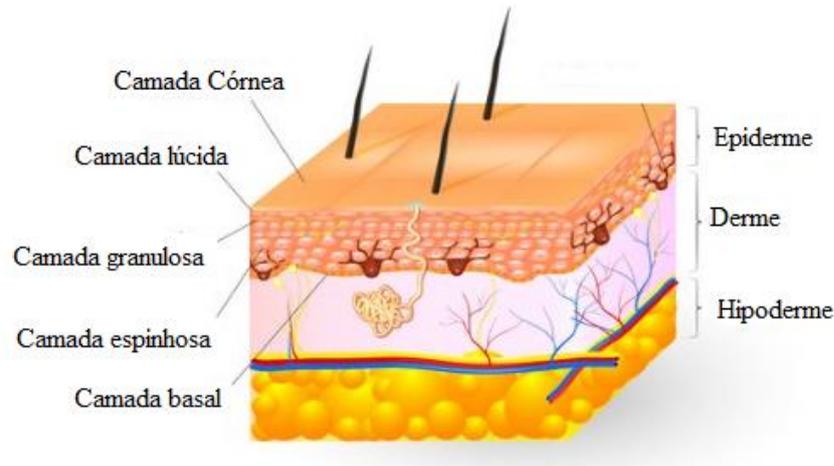
A pele é o maior órgão do corpo humano, atingindo cerca de 16% do peso corporal, e se caracteriza como um sistema complexo, que realiza o revestimento externo do corpo, recobrando toda sua superfície.

De acordo com Venus *et al.* (2011) e Junqueira & Carneiro (2013), suas principais funções são:

- Proteção do organismo contra desidratação e entrada de microrganismos, agindo como uma barreira física;
- Linha primária de defesa contra invasão de microrganismos, devido à presença de células do sistema imunológico;
- Proteção química contra a radiação ultravioleta, potencial causadora de danos químicos ao DNA das células, com consequentes efeitos carcinogênicos;
- Colaboração com a termorregulação do corpo, a partir do tecido adiposo, glândulas e vasos sanguíneos;
- Receptor sensorial, enviando informações do ambiente externo – toque, temperatura, pressão, dor, coceira - para o sistema nervoso central.

A pele é constituída pela epiderme, sua porção epitelial com origem ectodérmica, e a derme, que representa a porção conjuntiva de origem mesodérmica. Em continuidade à derme encontra-se a hipoderme, um tecido conjuntivo frouxo, que não faz parte da pele, e que pode ainda conter células de tecido adiposo, constituindo o panículo adiposo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). A figura 1 apresenta um desenho esquemático da pele e hipoderme, com suas respectivas camadas. Essas camadas, em conjunto a outros constituintes como unhas, pelos e glândulas configuram o sistema tegumentar (VENUS *et al.*, 2011).

Figura 1: Representação esquemática das camadas da pele e hipoderme humana.



Fonte: Adaptado de Shutterstock – layers of the human skin, 2017.

3.1.1. Epiderme

A epiderme é a porção mais externa da pele, e é responsável pela coloração da pele, bem como sua textura e impermeabilidade (LOSQUADRO, 2017). É constituída por um epitélio queratinizado, sendo as células mais abundantes em sua estrutura os queratinócitos, cuja principal função é a síntese de queratina. Se configura como uma região, e é subdividida em camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013), da camada mais profunda à mais superficial, e que possuem queratinócitos em diferentes estágios de maturação (LOSQUADRO, 2017). A figura 1 ilustra a posição e morfologia das subcamadas da epiderme.

A camada basal é responsável, junto à camada espinhosa, pela renovação da pele. Consiste, normalmente, de uma fileira única de células, e se encontra logo acima da membrana basal, que separa a derme da epiderme. A camada basal é rica em células tronco, apresenta intensa atividade mitótica, e realiza o processo de renovação da epiderme no período entre 15 e 30 dias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Seus queratinócitos, à medida que realizam o processo de migração para a camada espinhosa, vão gradualmente aumentando sua produção de queratina (MURPHREE, 2017).

A camada espinhosa possui filamentos de queratina em sua estrutura, e as células são interconectadas a partir de desmossomos. Estes componentes realizam papel importante para coesão entre as células e a resistência do tecido ao atrito. Na camada espinhosa existem também células-tronco comprometidas com a linhagem dos queratinócitos, as quais auxiliam, junto à camada basal o processo mitótico para manutenção da epiderme. A camada granulosa tem

fundamental contribuição na impermeabilização da epiderme, impedindo sua desidratação ou ainda a penetração de substâncias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Na camada lúcida, o citoplasma se encontra rico em filamentos de queratina, e as células são ainda interconectadas por desmossomos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Sua principal função é garantir espessura apropriada às palmas das mãos e pés. A camada córnea, mais superficial, é constituída por células mortas e sem núcleo, preenchidas por queratina. Estas células são constantemente destruídas e substituídas por outras de camadas mais profundas, e sua principal função é atuar como barreira contra a penetração de microrganismos (MURPHREE, 2017).

3.1.2. Derme

A derme é o tecido conjuntivo no qual se apoia a epiderme, unindo a pele à hipoderme. Para aumentar a área de contato entre derme e epiderme, existem, na base da epiderme, reentrâncias desta camada projetadas no sentido descendente, as quais encontram a superfície externa irregular da derme. Essa conexão ocorre em uma região denominada junção dermo-epidérmica, ou camada basal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Esse mecanismo de coesão permite o movimento conjunto das duas camadas de maneira simultânea (MURPHREE, 2017).

A derme é constituída principalmente de colágeno, elastina, vasos sanguíneos, terminações nervosas e glândulas. A derme é subdividida em duas camadas, a papilar, superficial, e a reticular, mais profunda, e as principais células residentes são os fibroblastos (LOSQUADRO, 2017). A camada papilar é constituída por tecido conjuntivo propriamente dito frouxo, que forma as papilas dérmicas, região superficial da epiderme, a qual se conecta à epiderme. Na camada papilar estão presentes pequenos vasos sanguíneos, os quais são responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A camada reticular está localizada abaixo da derme papilar, e se configura como uma camada mais espessa, constituída por tecido conjuntivo propriamente dito denso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Os anexos da epiderme, como folículos pilosos (responsáveis pela produção de pelos), glândulas sudoríparas (secreção de suor, de forma a regular a temperatura corporal), terminações nervosas e glândulas sebáceas (produtoras de lipídeos, com a função de lubrificação e impermeabilização da pele) se encontram na camada reticular (LOSQUADRO, 2017).

3.2. FERIDAS DE PELE

Quando a pele é lesionada, suas funções básicas de proteção são comprometidas. As lesões de pele podem ocorrer por fatores extrínsecos, como incisão cirúrgica ou trauma, e fatores intrínsecos, a partir de um processo inflamatório (ECHER *et al.*, 2010). Independentemente de sua origem, as lesões de pele são comumente denominadas de feridas.

3.2.1. Características das feridas

As feridas podem ser classificadas quanto à causa, o tipo de cicatrização, o grau de abertura e seu tempo de duração (ECHER *et al.*, 2010).

Com relação às causas, classifica-se as feridas como:

- Cirúrgicas: provocadas intencionalmente, a partir de incisão (sem perda de tecido), excisão (remoção de parte da pele) ou punção (resultam de procedimentos terapêuticos, como biópsia);
- Traumáticas: provocadas acidentalmente por agente mecânico (perfurações ou cortes), químico ou físico (temperatura e radiação);
- Ulcerativas: feridas resultantes de traumatismo ou patologias relacionadas do impedimento do suprimento sanguíneo, gerando necrose. As feridas ulcerativas podem ainda ser divididas em úlceras por pressão, de estase venosa, arteriais e diabéticas.

Quanto ao tipo de cicatrização, as feridas podem ser:

- Cicatrização por primeira intenção: feridas fechadas cirurgicamente, sem perda de tecidos;
- Cicatrização por segunda intenção: feridas onde há perda de tecidos, e a cicatrização ocorre mais lentamente;
- Cicatrização por terceira intenção: feridas corrigidas cirurgicamente de forma a apresentarem melhores propriedades funcionais e estéticas.

De acordo com grau de abertura, as feridas podem ser classificadas como:

- Abertas, quando as bordas da pele se encontram afastadas;
- Fechadas, quando as bordas da pele estão justapostas.

E, finalmente, quanto ao tempo de duração, as feridas são classificadas como:

- Agudas, quando recentes;
- Crônicas, quando apresentam tempo de cicatrização maior que o esperado.

As feridas crônicas são resultado de componentes multifatoriais, os quais comprometem o processo de reparação da lesão. Um dos principais indicadores de uma ferida crônica é sua incapacidade de re-epitelização, sendo que geralmente observa-se redução na atividade mitogênica quando comparadas a feridas agudas, fato observado não só em queratinócitos, mas também em fibroblastos da pele (MULHOLLAND *et al.*, 2017). O estado de inflamação crônica, presente nas feridas crônicas, ocorre como resultado da exposição prolongada das células presentes no local da lesão à citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que inibem a progressão natural da reparação da ferida (FERREIRA *et al.*, 2013).

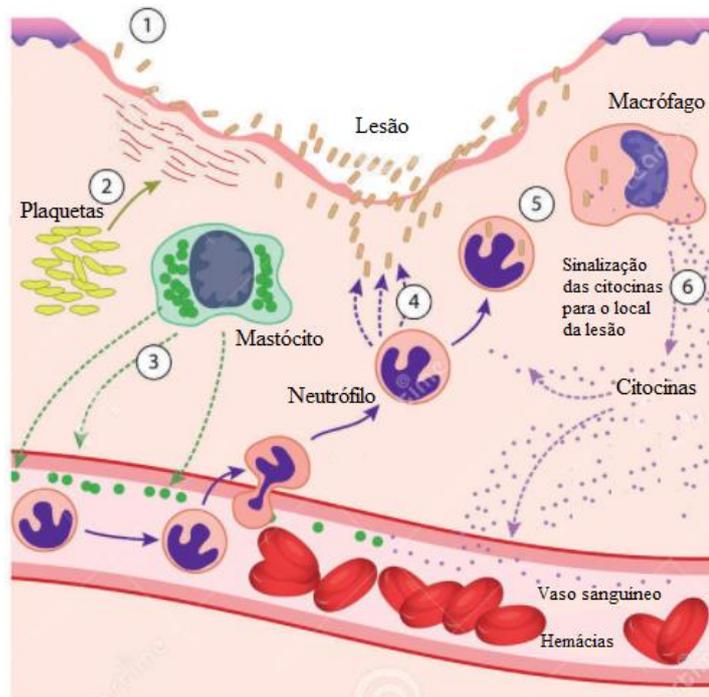
3.3. REPARAÇÃO DE FERIDAS

A reparação de feridas tem por objetivo imediato a restauração da integridade tecidual e é caracterizada como um processo biológico dinâmico, que envolve interações complexas entre células residentes, leucócitos recrutados, moléculas presentes na matriz extracelular e mediadores químicos. Este processo envolve três etapas: inflamação, proliferação e maturação (ou remodelação tecidual), e qualquer falha durante seu curso pode levar à formação de cicatrizes hipertróficas, queloides ou feridas crônicas (SOLEY *et al.*, 2016).

A inflamação é a reação imediata à lesão tecidual, e é uma tentativa de limitar o dano no tecido afetado. Ocorre então a hemóstase tecidual, ou seja, o processo de estancar o sangramento, selando a superfície e removendo tecido necrótico, microrganismos e quaisquer fragmentos estranhos presentes. O dano aos vasos sanguíneos resulta em agregação plaquetária, e ativação da cascata de coagulação, de forma a conter a hemorragia causada pela lesão (SOLEY *et al.*, 2016).

O início da inflamação é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, seguido de migração plasmática e migração celular, também chamada diapedese. O recrutamento de células pró-inflamatórias ocorre a partir de quimiocinas liberadas pelas plaquetas ativadas. Estas células pró-inflamatórias, bem como células residentes no tecido (queratinócitos), liberam fatores de crescimento e citocinas, realizando então a regulação do processo inflamatório (WANG & WINDBERGS, 2017). A combinação de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular leva aos chamados sinais cardinais da inflamação, caracterizados por rubor, edema, calor e dor (ECHER *et al.*, 2010). Os principais eventos da inflamação se encontram ilustrados na figura 2.

Figura 2 - Desenho esquemático dos principais eventos relacionados à inflamação.



1. Bactérias e outros agentes patogênicos penetram no local da lesão.
 2. Plaquetas iniciam o processo de coagulação no local da lesão.
 3. Mastócitos secretam sinalizadores, que medeiam a vasodilatação e geram aumento da permeabilidade vascular, acarretando em exsudação plasmática e celular.
 4. Neutrófilos secretam substâncias letais aos organismos patogênicos.
 5. Neutrófilos e macrófagos fagocitam os organismos patogênicos;
 6. Macrófagos secretam citocinas, atraindo células do sistema imune ao local da lesão, e ativando células envolvidas na reparação tecidual.
- A resposta inflamatória continua, até que todos os organismos estanhos sejam eliminados e a lesão reparada.

Fonte: Adaptado de Dreamstime – Inflammation and tissue repair, 2017.

A fase proliferativa se caracteriza pelo início do reparo da ferida, a partir da angiogênese, fibroplasia e epitelização. Nesse estágio é formado o chamado tecido granuloso, formado por leito capilar, fibroblastos, macrófagos e uma rede de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico (ECHER *et al.*, 2010).

As células mesenquimais presentes no tecido conjuntivo se diferenciam em fibroblastos, que são atraídos quimicamente ao sítio de inflamação, onde se dividem e produzem matriz extracelular. Como são células com alta capacidade proliferativa, podem ocupar espaços de outras células mais especializadas, formando então tecido fibroso (fibroplasia). O processo de re-epitelização começa poucas horas após a lesão, iniciando-se com o fechamento da ferida a partir de coágulos sanguíneos, e subsequente migração de células epiteliais (ECHER *et al.*, 2010).

Os queratinócitos da camada basal da epiderme, ou presentes profundamente no epitélio, migram para a superfície da ferida. A epitelização segue então estágios de mudanças dos queratinócitos, que consistem em migração, proliferação, diferenciação e estratificação (ECHER *et al.*, 2010).

Na fase de maturação ocorre a contração da ferida, reduzindo a quantidade de cicatriz desorganizada. A contratura da ferida, por sua vez, é uma constrição física ou limitação da função do tecido original, e ocorre quando a cicatriz excede a capacidade de contração da ferida normal (ECHER *et al.*, 2010). Esta fase é governada pelo rearranjo da matriz extracelular recém-formada, na qual fibras colágenas tipo I substituem fibras colágenas tipo III. A quantidade de água e proteoglicanos diminui, enquanto há formação de elastina de forma a aumentar a elasticidade do tecido. Além disso, as fibras colágenas se rearranjam estruturalmente, aumentando sua organização, bem como seu diâmetro (WANG & WINDBERGS, 2017).

A rápida produção de colágeno pelos fibroblastos leva a seu arranjo desordenado, causando então tecido fibroso – a cicatriz (CUI *et al.*, 2017). Quando comparada à pele intacta, a cicatriz formada apresenta-se frágil e com baixa elasticidade, sendo sua resistência à tração muito mais baixa que no tecido íntegro (ECHER *et al.*, 2010). Dessa maneira, a busca por maneiras de acelerar o processo reparativo da pele é crucial, de maneira a evitar a formação de cicatriz, promovendo então a regeneração do tecido original (CUI *et al.*, 2017).

A reparação rápida das feridas é essencial, pois a exposição prolongada do tecido às substâncias pró-inflamatórias pode causar ainda mais lesões. Macrófagos superativados sofrem fusão, e podem liberar componentes digestivos no tecido, como espécies reativas de oxigênio, enzimas lisossomais e óxido nítrico. A falha na reparação rápida das feridas leva então à inflamação crônica, resultando em feridas de difícil reparação (CUI *et al.*, 2017).

3.4. TRATAMENTO DE FERIDAS

Tradicionalmente, o tratamento de feridas ocorre a partir do controle de suas causas, como infecções, isquemia ou diabetes, permitindo assim que o processo de reparação tecidual seja feito normalmente pelo próprio organismo. Entretanto, em feridas crônicas como úlceras de pressão e úlceras do pé diabético que ocorrem devido a processos sistêmicos causados por enfermidades, pode haver interferência nos processos bioquímicos e fisiológicos na região da lesão. Como consequência, o processo de reparação tecidual é retardado ou até mesmo mantido na fase inflamatória, levando à diversas complicações da enfermidade (CAPANEMA *et al.*, 2017).

Lesões de pele causadas por acidentes, queimaduras, traumas e feridas crônicas se configuram como um grave problema na área médica. Estima-se que aproximadamente 20% dos pacientes diabéticos são propensos a desenvolver feridas crônicas nos pés. Adicionalmente,

de acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 300 mil mortes ocorrem anualmente como resultado de queimaduras resultantes de incêndios. Desta forma, existe uma demanda crescente por biomateriais apropriados para tratar e auxiliar na reparação de lesões de pele (CAPANEMA *et al.*, 2017).

De acordo com Echer *et al.* (2010), o tratamento adequado de uma ferida depende de uma avaliação local criteriosa. É necessário observar a localização anatômica da ferida, bem como sua forma, tamanho, profundidade e presença e quantidade de tecido necrótico. O tratamento de feridas deve ocorrer por meio de ações para remover as barreiras que impedem sua reparação; essas barreiras são expressas pela sigla TIME, na qual cada letra representa uma característica a ser avaliada.

As letras da sigla TIME significam as palavras em inglês *tissue*, *infection*, *moisture* e *edge*. ‘*Tissue*’ refere-se ao tecido inviável, necrótico ou deficiente presente na ferida, que deve ser retirado, de modo a obter tecido viável no leito da ferida. ‘*Infection*’ refere-se ao tecido com infecção por microrganismos ou inflamação prolongada, e que apresenta número elevado de citocinas inflamatórias; esses tecidos apresentam atividade de proteases e baixa atividade de fatores de crescimento, fatores prejudiciais à cicatrização. Neste caso, a ferida deve ser limpa, e pode-se utilizar anti-inflamatórios e antimicrobianos para contenção da inflamação e da infecção. ‘*Moisture*’ se refere à manutenção da umidade. Uma ferida com seu leito ressecado ocasiona migração lenta de células epiteliais. ‘*Edge*’ refere-se à epitelização das bordas, ou seja, ocorre progressão da cobertura epitelial a partir das bordas. Quando isso não ocorre, as células da ferida não respondem, e a cicatrização é comprometida.

Após a avaliação destes fatores locais na ferida, deve-se analisar também fatores sistêmicos que tem potencial para afetar o processo de reparação da pele e dos tecidos. Segundo Echer *et al.* (2010), dentre os aspectos sistêmicos a serem avaliados, destaca-se:

- Idade: a idade avançada está associada a diversas alterações nutricionais, metabólicas, vasculares e imunológicas, que por vezes tornam os indivíduos mais susceptíveis ao trauma e infecção, bem como ao desenvolvimento de doenças crônicas;
- Estado nutricional: água, vitaminas A e C e do complexo B, e certos oligoelementos, como zinco, ferro, cobre e manganês, são nutrientes que desempenham papéis fundamentais no processo de reparação da pele, como a síntese de colágeno, a proliferação da epiderme e a neovascularização;

- Imobilidade: indivíduos com mobilidade diminuída podem desenvolver úlceras de pressão, devido à isquemia derivada da diminuição do fluxo sanguíneo, fator que limita e reduz a cicatrização de feridas;
- Vascularização: a reparação dos tecidos depende essencialmente de uma boa oxigenação e trocas gasosas na região, feita a partir de artérias e veias em bom funcionamento.

O tratamento da ferida deve envolver então a avaliação de condições clínicas do paciente, bem como uso medicamentos e o desbridamento de tecido inviável. Além disso, deve-se realizar avaliações diárias da evolução da ferida, de forma a continuar ou modificar as condutas de tratamento até então estabelecidas (ECHER *et al.*, 2010).

O curativo é um dos tratamentos utilizados para auxiliar na reparação de feridas, proporcionando um ambiente adequado ao processo de cicatrização. Durante o processo de reparação tecidual, os principais papéis de um curativo são (VOWDEN *et al.*, 2017):

- Proteger a ferida contra traumas mecânicos;
- Manter a umidade na lesão, de modo a facilitar a migração celular, bem como diminuir a nocicepção;
- Promover a remoção/contenção do excesso de exsudato;
- Promover isolamento térmico, maximizando o metabolismo celular;
- Permitir a realização de trocas gasosas da ferida com o meio externo;
- Minimizar a formação de tecido cicatricial.

É ainda requerido que o curativo seja impermeável à entrada de microrganismos, seja biocompatível, confortável e maleável (VOWDEN *et al.*, 2017). Devido às propriedades físico-químicas necessárias a essa aplicação, materiais poliméricos são amplamente utilizados como curativos.

3.5. CURATIVOS POLIMÉRICOS

Segundo Kamoun *et al.*, (2017), os curativos poliméricos são classificados por tipo de produto, e consistem em: espumas, hidrogéis, alginatos, hidrocoloides e filmes.

As espumas são utilizadas em queimaduras, feridas crônicas e úlceras profundas. Os materiais mais utilizados são o poliuretano, polietilenoglicol (PEG) e silicone. Apresentam alta capacidade de absorção de exsudato e mantém a ferida úmida. Porém, assim como os filmes, são aderentes, dificultando sua remoção; são opacos, dificultando a visualização da ferida; não

apresentam boa permeabilidade a gases; não são aplicáveis em feridas úmidas e apresentam baixa estabilidade química (KAMOUN *et al.*, 2017).

Os hidrogéis são amplamente utilizados em grande parte de feridas e queimaduras, e são constituídos de polímeros naturais e sintéticos que apresentam grande capacidade de absorção de água. Os hidrogéis não aderem ao tecido lesionado, sendo facilmente removidos; conseguem absorver grandes quantidades de exsudato; apresentam fácil processamento e manuseio. Porém, não apresentam transparência adequada, têm baixa permeabilidade a gases e vapor de água, são uma barreira ineficaz contra microrganismos, e podem apresentar baixa estabilidade mecânica (KAMOUN *et al.*, 2017).

Os alginatos são utilizados em feridas cirúrgicas e queimaduras de grande extensão, sendo utilizados na forma de fibras entrelaçadas. São altamente absorventes, não aderentes, apresentam boa estabilidade mecânica, se mantendo estável por longos períodos, funcionam como boa barreira contra microrganismos, e são facilmente removidos por soluções salinas. No entanto, apresentam alto custo, odor desagradável e são de difícil manuseio (KAMOUN *et al.*, 2017).

Os hidrocoloides são sistemas de duas fases, constituídos de amido imobilizado com iodina, dextrano de PEG ou polímeros em tecidos entrelaçados, e são utilizados para tratamento de úlceras crônicas e queimaduras. São altamente absorventes; não aderentes e de fácil remoção a partir de solução salina ou água destilada e apresentam alta densidade. Entretanto, apresentam certo grau de citotoxicidade, e a presença de dextrans na estrutura retarda o processo de reparação tecidual; são impermeáveis a gases, impedindo a troca gasosa na lesão; apresentam odor desagradável e mudanças na coloração (KAMOUN *et al.*, 2017).

Os filmes poliméricos são indicados para lesões superficiais, tem pequena espessura, são aderentes e flexíveis. Permitem boa permeabilidade de gases, facilitando as trocas gasosas da região lesada com o meio externo; são impermeáveis a microrganismos e fluidos; são transparentes, facilitando o monitoramento da lesão. Entretanto, como são aderentes à região da ferida, removem tecido em reparação durante sua remoção; além disso, não absorvem exsudato, possibilitando seu acúmulo e colonização bacteriana, por isso devem ser trocados periodicamente (KAMOUN *et al.*, 2017).

3.5.1. Filmes poliméricos como curativos

Devido às propriedades físico-químicas necessárias à aplicação, filmes poliméricos são amplamente utilizados como curativos. De acordo com García *et al.*, (2017), um curativo do

tipo filme polimérico deve ser produzido a partir de polímeros biocompatíveis e não citotóxicos, serem elásticos, macios, e ainda apresentar resistência mecânica adequada, de forma a suportar as tensões as quais o curativo será submetido. Inúmeros trabalhos descrevem a produção de filmes constituídos por diferentes tipos de polímeros para aplicação como curativos: fibroína de seda, queratina, quitosana (GANESAN, 2017), carboximetilcelulose (VINKLÁRKOVÁ *et al.*, 2017), poli (óxido de etileno) (BOATENG *et al.*, 2013), alginato de sódio (LI *et al.*, 2017), etc. Mais recentemente diversas substâncias como fármacos, agentes antimicrobianos e princípios ativos têm sido incorporados a filmes poliméricos para agregar diferentes propriedades.

GANESAN (2017) produziu e caracterizou filmes biodegradáveis para aplicação como curativos. Filmes de fibroína de seda, queratina e quitosana produzidos a partir de evaporação de solvente e incorporados com mel foram caracterizados. Os filmes apresentaram resistência à tração moderada, com valores de alongação razoáveis, sugerindo bom potencial para aplicação como curativos. Os filmes exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas e não apresentaram citotoxicidade para fibroblastos.

Vinklárková *et al.* (2017) produziram filmes poliméricos a partir do método de evaporação de solvente, com potencial aplicação para curativos. A uma matriz de carboximetilcelulose foi adicionado cloridrato de lidocaína, um composto ativo com propriedades analgésicas. Os filmes se apresentaram rígidos quando secos, mas flexíveis quando em contato com água, indicação de uma boa adaptabilidade a feridas; pH superficial ácido, o qual auxilia a reparação de feridas, inibindo crescimento microbiano; observou-se também alta taxa de liberação do anestésico. Desta forma, os filmes apresentaram potencial para utilização como curativos, com eficiente ação anestésica tópica na ferida.

Boateng *et al.*, (2013) produziram, a partir do método de evaporação de solvente, filmes de poli (óxido de etileno) (Polyox) e carragenina, para utilização como curativos com liberação controlada de fármacos. Aos filmes, foram adicionados estreptomicina, um antibiótico, e diclofenaco, um anti-inflamatório, minimizando a sensação de dor e inchaço. Os filmes obtidos apresentaram transparência e superfície homogênea, ideal para observação progressiva da reparação de feridas. Observou-se também alta flexibilidade e boa capacidade de contenção de exsudato. Os testes de liberação controlada de fármacos e testes antimicrobianos demonstraram que os filmes conseguem inibir o crescimento de diferentes espécies microbianas comumente encontradas em feridas crônicas.

Li *et al.*, (2017) produziram blendas poliméricas de fibroína e alginato de sódio carregadas com estrôncio, e avaliaram suas propriedades físico-químicas a partir de diferentes técnicas de caracterização, além de sua citotoxicidade *in vitro*. O foco principal do trabalho foi a indução da angiogênese no tecido lesado, além da atividade antimicrobiana do filme. Foram observadas excelentes características físico-químicas no filme, além de boa atividade biológica. Além disso, inferiu-se também que os filmes apresentam atividade antimicrobiana. O estudo sugere que os filmes de fibroína e alginato de sódio carregados com estrôncio são biomateriais promissores à aplicação como curativos.

Percebe-se então, uma forte tendência pela busca de filmes poliméricos para aplicação como curativos, aos quais são adicionadas diferentes substâncias para agir como agentes antimicrobianos, analgésicos ou anti-inflamatórios. Estas estratégias são desenvolvidas para propiciar a reparação do tecido lesado o mais rapidamente possível, visando melhoria na qualidade de vida de indivíduos acometidos por feridas agudas ou crônicas.

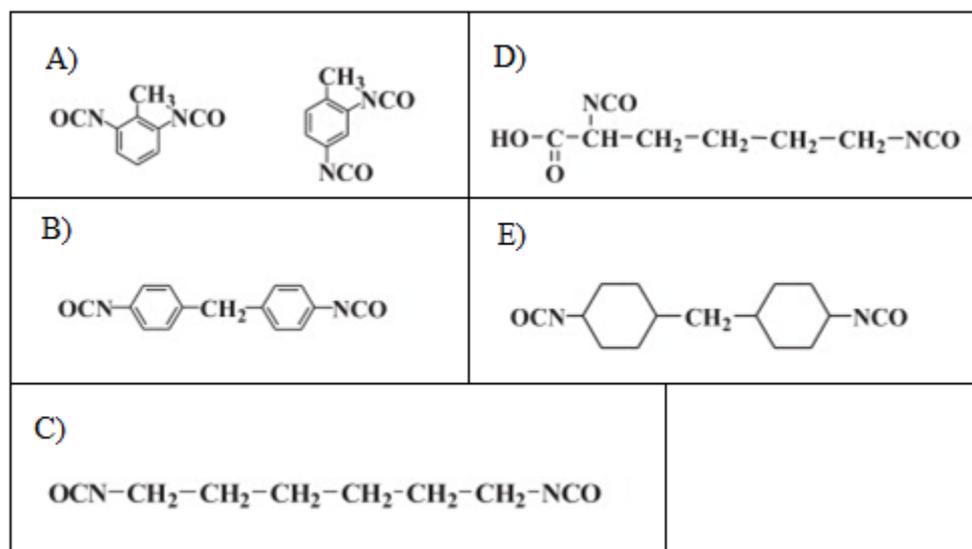
3.6. POLIURETANOS

Diversos polímeros de origem sintética ou natural vêm sendo empregados em aplicações biomédicas. Os polímeros naturais são de interesse devido a sua boa reabsorção pelos tecidos, baixa toxicidade, além de baixo custo de processamento e descarte. Entretanto, suas propriedades físicas e mecânicas nem sempre correspondem àquelas dos tecidos vivos, além de apresentarem pouco controle em seus mecanismos de biorreabsorção e possibilidade de transmitir doenças, fazendo-se necessário realizar triagens e purificações (JANIK & MARZEC, 2015).

Desta forma, a utilização de polímeros sintéticos apresenta-se como uma forma de solucionar essas questões. A estrutura química de polímeros sintéticos pode ser projetada de forma a obter-se propriedades físicas requeridas à aplicação, bem como sua capacidade de degradação. Estes materiais podem ser processados em diversos formatos e porosidades, e serem funcionalizados com diferentes biomoléculas (CHIONO *et al.*, 2017).

Dentre os polímeros sintéticos, os poliuretanos são amplamente utilizados como biomateriais. Sua estrutura em domínios propicia a esses materiais uma vasta gama de propriedades físico-químicas, dependendo da composição (CHIONO *et al.*, 2017). Os poliuretanos foram primeiramente descritos por Otto Bayer, no ano de 1947, sendo suas principais matérias-primas os diisocianatos e dióis/polióis, que, a partir do processo de

Figura 4 – Estruturas químicas de diisocianatos comumente utilizados para a síntese de poliuretanos.



A) 2,4- e 2,6-tolueno diisocianato (TDI); B) 4,4'-difenilmetano diisocianato (MDI); C) 1,6- hexametileno diisocianato; D) lisina-diisocianato; E) 4,4'-metil bis (ciclohexil isocianato).

Fonte: Adaptado de Cherng *et al.*, 2013.

Dentre os isocianatos aromáticos, destaca-se o tolueno diisocianato e o difenilmetano diisocianato. O tolueno diisocianato (TDI), normalmente uma mistura dos isômeros 2,4 e 2,6, é um isocianato de funcionalidade dois, e apresenta maior reatividade do grupamento –NCO ligado ao carbono de posição 4 em relação ao mesmo grupamento presente nos carbonos 2 e 6. Os difenilmetano diisocianatos (MDI) são os isocianatos mais consumidos pelo mercado de poliuretanos; sua estrutura química, mais complexa, é menos volátil em relação ao TDI, e permite maior liberdade para construção de um poliuretano que atenda a especificações desejadas para sua aplicação (VILAR, 2004).

Com relação aos polióis utilizados, destaca-se os polióis poliéteres (PPG's), os polióis poliésteres, além de polióis obtidos a partir de óleos vegetais. Geralmente, polióis que dão origem a espumas flexíveis e elastômeros possuem massa molar entre 1000 e 6000 g/mol, e funcionalidade entre 1,8 e 3. As espumas rígidas, que apresentam alto teor de ligações cruzadas, são oriundas de polióis de cadeia curta (entre 250 e 1000 g/mol) e funcionalidade alta (entre 3 e 12). Dentre os poliéteres mais comuns, destaca-se o poli(óxido de propileno) glicol e copolímeros com poli(óxido de etileno) glicol. Além dos polióis poliéteres, deve-se destacar também os polióis poliésteres alifáticos, utilizados em aplicações de alta performance e os polióis poliéster aromáticos, usados em espumas rígidas (VILAR, 2004).

Os poliuretanos são uma classe de polímeros versáteis, apresentando-se como termofixos, termoplásticos, e ainda elastômeros, dependendo das moléculas utilizadas na sua síntese. Sua flexibilidade propicia sua aplicação desde espumas e adesivos até revestimentos de tecido (VILAR, 2004). Apresentam alta elasticidade, resistência ao rasgo, umidade e oxidação, além de elevada resistência à tração e alto ponto de fusão, resistência ao desgaste, resistência à degradação por óleos, água e outros solventes (HOWARD, 2002).

Os poliuretanos são geralmente insolúveis em água, mas podem sofrer hidrólise catalisada por enzimas como esterases (catalisam hidrólise de ligações éster), proteases (catalisam hidrólise de ligações amina), e ureases (catalisam a hidrólise de grupos funcionais ureia) (COSTA *et al.*, 2015). Com relação à taxa de degradação, poliuretanos poliésteres são significativamente mais susceptíveis à hidrólise, quando comparados aos poliuretanos formados a partir de moléculas de poliéter; por outro lado, estes últimos estão mais inclinados à degradação oxidativa (GRACIOLI, 2016). De acordo com Ozsagiroglu *et al.* (2012), a degradação enzimática de poliuretanos ocorre em três etapas: dissolução química das ligações éster e/ou amida, seguido de redução da massa molar e viscosidade do polímero, e finalmente a clivagem de toda a cadeia polimérica, resultando assim na formação de seus monômeros.

As propriedades térmicas do poliuretano variam de acordo com a escolha dos reagentes para sua síntese, bem como com a quantidade relativa de segmentos rígidos e flexíveis. Os segmentos flexíveis, relativos aos polióis presentes, são alternados aos segmentos rígidos, estruturando o polímero em domínios (VILAR, 2004). A degradação térmica dos poliuretanos ocorre em etapas, condizentes então com a sua porção rígida e flexível. A decomposição térmica dos grupos uretano, os segmentos rígidos do polímero, se apresenta em temperaturas entre 250-350 °C, enquanto os segmentos flexíveis apresentam temperaturas de degradação entre 350-500 °C. A literatura aponta também que sua temperatura de transição vítrea ocorre em temperaturas abaixo de 0 °C (FIORIO *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2000). Porém, devido a vasta possibilidade de matérias-primas para a síntese do polímero, não é possível apontar uma propriedade geral para temperatura de fusão dos poliuretanos, sendo então considerados termoplásticos se a temperatura acima da faixa de fusão de seus segmentos rígidos forma um material viscoso e capaz de ser processado (VILAR, 2004).

Os poliuretanos são amplamente utilizados como biomateriais devido à sua biocompatibilidade, flexibilidade, resistência à degradação enzimática e hidrolítica, devido ao uso de polióis poliéter, transparência, devido a presença de cadeias amorfas (propiciado pelos isocianatos não aromáticos), e resistência ao rasgo. A literatura descreve sua utilização como

pele artificial, enxertos vasculares, conexões neurais, enxertos ósseos e materiais para reparo de cartilagem articular. Estudos recentes descrevem, também, a possibilidade de utilização de sistemas utilizando poliuretano para aplicação como *scaffolds* (JANIK & MARZEC, 2015). A combinação de suas diversas propriedades físico-químicas justifica então a utilização de poliuretanos também para o tratamento de feridas, na forma de filme polimérico. Como um bom curativo, o filme de PU deve ser biocompatível, transparente, para facilitar a avaliação progressiva da ferida, flexível e maleável, com boa resistência ao rasgo; apresentar permeabilidade a gases, propiciando trocas gasosas, essenciais no processo reparatório de lesões, impermeabilidade a microrganismos, protegendo a região da ferida, e capacidade de contenção do exsudato plasmático.

Os poliuretanos já são amplamente comercializados como produtos para curativos. Os principais curativos de poliuretano comercializados na clínica, pelas empresas Curatec e Hartmann, estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Principais curativos de poliuretano produzidos e comercializados pela Curatec

| Tipo de curativo | Nome e preço do produto | Indicações |
|-------------------------|--|--|
| Espuma | Espuma de poliuretano 10cm x 10cm R\$31,20 | Tratamento de lesões superficiais que cicatrizam por segunda intenção, lesões em fase de granulação, com maior nível de exsudato incluindo úlceras em membros inferiores, úlceras diabéticas e úlceras por pressão. |
| | Silver Foam 10cm x 10cm R\$83,70 | Lesões com maior nível de exsudato, reduzindo o odor causado por microrganismos. Pode ser utilizado em: úlceras em membros inferiores, úlceras diabéticas, úlceras por pressão, feridas pós-operatórias, queimaduras, áreas doadoras e abrasões de pele. |
| Filme | Curativo pós-operatório 9cm x 10cm R\$15,30 | Feridas pós-operatórias que cicatrizam por primeira intenção, podendo permanecer na ferida por até sete dias. |
| | Filme Transparente Estéril 9cm x 10cm R\$14,70 | Feridas cirúrgicas limpas e sem exsudação, proteção de pele íntegra e de úlceras por pressão, fixação de curativos primários, proteção de tatuagens, fixação de cateteres |
| | Filme Transparente Rolo 10cm x 2m R\$90,20 | Fixação e cobertura de feridas, cobertura de suturas, fixação de tubos, drenos e bolsas de perna, proteção de proeminências ósseas, proteção de tatuagens |

Fonte: Loja Curatec®, 2017.

Tabela 2 – Principais curativos de poliuretano produzidos e comercializados pela Hartmann

| Tipo de curativo | Nome e preço do produto | Indicações |
|-------------------------|---|---|
| Espuma | PermaFoam 11cm x 11cm R\$28,31 | Feridas limpas com exsudato moderado a abundante |
| | HydroTac 10cm x 10cm R\$78,00 | Feridas com exsudato leve a moderado nas fases de granulação e epitelização |
| Hidrogel | Hydrosorb Comfort e Placa 7,5cm x 10cm R\$239,12 (cx. 5 unidades) | Feridas crônicas, de difícil cicatrização e nas fases de granulação, queimaduras de segundo grau e para amolecer e hidratar tecido necrótico. Utilizar após controlar o excesso de exsudato ou sangramento. |
| Hidrocoloide | Hydrocoll 10cm x 10cm R\$18,92 | Feridas crônicas e de lenta cicatrização, em feridas de média a alta exsudação, úlceras venosas ou por decúbito, feridas de segundo grau, e feridas na fase de epitelização. |

Fonte: Bace Healthcare – Hartmann Group, 2017.

Além dos produtos já utilizados na clínica, diversas pesquisas estudam a utilização de filmes de poliuretano como curativos. Barrioni *et al.*, (2015) sintetizaram filmes de poliuretano biodegradáveis. Os filmes foram caracterizados a partir de ensaios de avaliação de estrutura, propriedades mecânicas e testes biológicos. Os filmes de poliuretano amorfos apresentaram alta capacidade de absorção de água, se comportando como um hidrogel, devido a ligações cruzadas presentes em sua estrutura. A partir de análises biológicas *in vitro*, foram considerados bons candidatos para aplicações biomédicas.

Rezapour-Lactoe *et al.* (2016) produziram membranas de poliuretano/siloxano com propriedades termorresponsivas. O *scaffold* apresentou boa resistência a tração, e hidrofobicidade moderada, permitindo a proteção contra o meio externo, e mantendo a região úmida, de forma a propiciar reintegração tecidual mais rapidamente. A partir de testes realizados *in vivo*, mostrou-se que feridas induzidas em camundongos cobertas com membranas carregadas com células epiteliais permitiu a completa re-epitelização da ferida, com redução do tempo de regeneração tecidual.

Lima Junior *et al.*, (2009) empregaram filmes transparentes de poliuretano como cobertura de áreas doadoras de enxerto de pele de espessura parcial. Concluiu-se que o poliuretano foi uma boa opção para promover a proteção da área contra desidratação e traumas,

além de contribuir para a redução do tempo até a completa re-epitelização, proporcionando conforto ao paciente, e facilidade de aplicação.

Dentre as diversas composições químicas possíveis dos poliuretanos, o presente trabalho utilizou o poliuretano termoplástico DELTHANE[®] E85, proveniente da reação entre um poliálcool poliéter, ou seja, uma molécula com pelo menos dois grupos hidroxila (-OH) e grupamentos éter (R-O-R') presentes na estrutura, e um 4,4' – difenilmetano diisocianato (MDI). O principal motivo da sua escolha é sua conhecida biocompatibilidade; além disso, este poliuretano apresenta boa resistência ao desgaste e abrasão, excelente flexibilidade, inclusive para baixas temperaturas, além de ser isento de plastificantes. É um material quimicamente estável, por ser formado a partir de poliálcool poliéter, e a ausência de plastificantes em sua estrutura (DELMAC DO BRASIL, 2013). A tabela 3 apresenta as principais propriedades do poliuretano DELTHANE[®] E85.

Tabela 3 – Principais propriedades do poliuretano DELTHANE[®] E85.

| Ensaio | DELTHANE [®] E85 |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Massa Molar (g/mol) | 50.000 |
| Dureza (Shore A) | 85+-3 |
| Densidade (g/cm ³) | 1,12 |
| Tensão Ruptura (Kg/cm ²) | 400 |
| Alongamento Ruptura (%) | 580 |

Fonte: Adaptado de DELMAC DO BRASIL, 2013.

3.7. ÓLEO DE COPAÍBA

O óleo de copaíba é uma óleo-resina natural, extraída do tronco de diversas espécies de plantas do gênero *Copaifera*, pertencentes à família *Fabaceae*, subfamília *Caesalpinioideae* (TOBOUTI *et al.*, 2017). São leguminosas nativas às regiões tropicais da América Latina e da região oeste da África. No território brasileiro, existem mais de vinte diferentes espécies, ocorrendo principalmente na região Amazônica (MARANGON *et al.*, 2017).

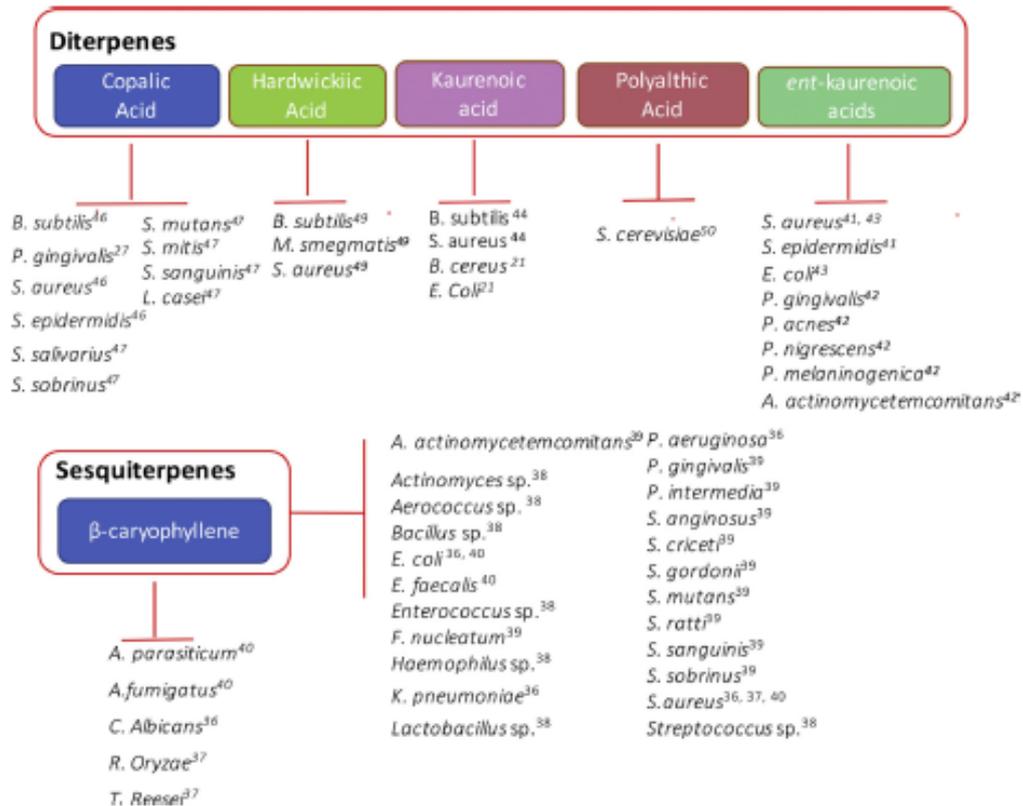
Relatos da utilização do óleo de copaíba podem ser datados desde os primórdios da colonização do Brasil, no século XVI, com o uso medicinal do composto pelos indígenas. Aplicava-se o óleo em umbigos de recém-nascidos, de forma a evitar infecções. Na região Norte do Brasil, onde a população dispõe de poucos fármacos industrializados, utiliza-se amplamente o óleo de copaíba na medicina popular em diversas aplicações, como por exemplo a partir da

administração oral, para tratar infecções de garganta, por aplicação tópica do óleo *in natura* ou ainda em pomadas. Diversos estudos confirmam suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais e analgésicas (CASCON & GILLBERT, 2000; VEIGA JR. *et al.*, 2001).

As composições dos óleos de copaíba podem variar, dependendo da espécie de copaíba, bem como da época de extração do óleo. De maneira geral, esta óleo-resina é constituída de uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos, cujas composições variam entre as espécies. Os terpenos são substâncias orgânicas formadas por unidades de isopreno, sendo o sesquiterpeno constituído por três unidades do isopreno, e os diterpenos, por quatro unidades (DEWICK, 2002; MARANGON *et al.*, 2017). A maior parte dos sesquiterpenos presentes no óleo de copaíba são hidrocarbonetos, álcoois e epóxios, sendo que aproximadamente 50% desta composição é composta de β -cariofileno, o qual apresenta atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, além do α -humuleno, α -bergamoteno e δ -cadineno. Já com relação aos diterpenos, identifica-se diversos ácidos carboxílicos, sendo o ácido copaílico o principal componente para a espécie *Copaifera multijuga*, enquanto para a espécie *Copaifera reticulata* Ducke, os principais ácidos são o caurenóico e o kolavênico (TOBOUTI *et al.*, 2017). Além destes, também estão presentes o ácido Hardwickiic e ácido acetoxi-copaílico, substâncias conhecidas por sua atividade antimicrobiana. Dentre outros constituintes identificados, destaca-se o β -bisabolol, um agente anti-inflamatório e antitumoral; o α -copaeno, o qual apresenta propriedades antitumorais; e o β -cadieno, com ação antifúngica (LAMA *et al.*, 2014; BONAN *et al.*, 2015; CARVALHO, 2016).

Uma das propriedades biológicas mais intensamente estudadas do óleo de copaíba é sua atividade antimicrobiana, entretanto, diferentes microrganismos podem ser mais eficientemente inibidos com diferentes componentes do óleo. A Figura 5 ilustra alguns componentes presentes no óleo de copaíba e sua inibição contra diferentes bactérias e fungos.

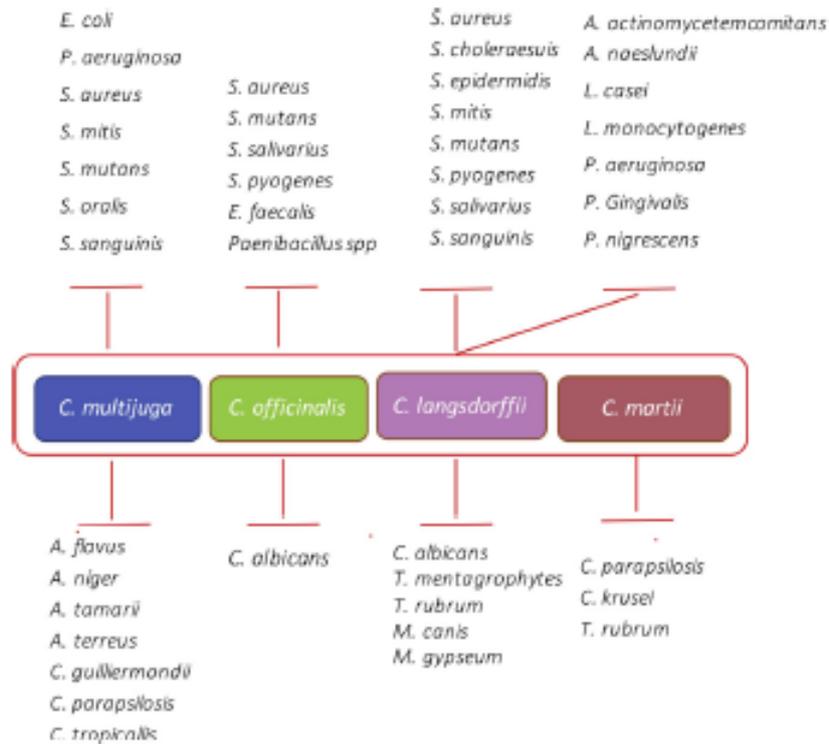
Figura 5 – Principais componentes do óleo de copaíba e a inibição contra diferentes bactérias e fungos



Fonte: Tobouti *et al.*, 2017

De acordo com Tobouti *et al.* (2017), acredita-se que a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba está relacionada à combinação de sesquiterpenos e diterpenos, afetando a integridade das paredes celulares de bactérias. Além disso, o óleo mostrou também ação antifúngica contra diferentes espécies. A figura 6 relaciona algumas das principais espécies de copaíba e os respectivos fungos e bactérias inibidos por cada um.

Figura 6 – Esquema das principais espécies de copaíba e dos microrganismos inibidos



Fonte: Tobouti *et al.*, 2017.

A literatura aponta diversos estudos das propriedades antimicrobianas do óleo de copaíba em biomateriais. Bonan *et al.*, (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de nanofibras de ácido poli lático (PLA)/polivinilpirrolidona (PVP) contendo 20% de óleo de copaíba. O PLA e o óleo apresentam estruturas hidrofóbicas, porém, a adição de PVP gerou um aumento na hidrofiliabilidade observada nas nanofibras. A análise química demonstrou que o principal componente do óleo foi o β -cariofileno, e os testes de atividade antimicrobiana mostraram inibição contra *Staphylococcus aureus*, sendo maior a liberação do óleo quanto maior a concentração de PVP na blenda polimérica. Concluiu-se então que a produção das nanofibras carregadas com óleo de copaíba tem promissoras aplicações biomédicas.

Marangon *et al.* (2017) produziram uma formulação para uma emulsão de quitosana/gelatina/óleo de copaíba, com potencial controle de crescimento bacteriano das espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*. A produção de uma emulsão é benéfica para aplicação tópica, devido às cargas catiônicas, gerando aumento da hidrofiliabilidade do composto, aumentando sua biocompatibilidade, resultando em uma boa estratégia para tratamento de inflamações de pele, bem como infecções bacterianas. A utilização combinada dos três compostos diminuiu a toxicidade, com relação aos compostos isolados; este

fato, aliado à atividade antimicrobiana observada, sugerem que a formulação da emulsão pode ser uma nova estratégia para o desenvolvimento de produtos à base de óleo de copaíba para controle de infecções bacterianas, principalmente contra *S. aureus*, que foi o microrganismo com a maior inibição gerada para o óleo.

Além disso, a literatura descreve também o óleo de copaíba sendo utilizado para auxiliar a reparação de feridas de pele. Estevão *et al.*, (2013) avaliaram os efeitos da aplicação tópica de pomada de óleo de copaíba em lesões de pele de camundongos, causadas para realização de enxertos. Os estudos demonstraram correlação entre a utilização das pomadas contendo óleo de copaíba, e a diminuição do aparecimento de tecido necrótico na região da lesão, indução do processo de angiogênese, indicando melhora no processo de reparação tecidual.

Pascoal *et al.* (2017) produziram curativos a partir de biopolímeros impregnados com óleo de copaíba, como um promissor agente contra *Leishmania sp.* A atividade leishmanicida, proporcionada pela presença de β -cariofileno, foi comprovada, e o processo de impregnação do óleo de copaíba a filmes poliméricos foi bem-sucedido, abrindo uma nova perspectiva para o combate da leishmaniose.

Tendo em vista a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antifúngica do óleo de copaíba relatada na literatura, desperta-se o interesse de sua utilização em curativos. Desta maneira, aliando-se as propriedades do poliuretano, que o fazem um bom candidato para produção de filmes transparentes, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de filmes de poliuretano biocompatível com óleo de copaíba para potencial aplicação como curativos.

3.8. LINHAGEM HACAT

A implementação de um novo biomaterial para utilização na clínica é um processo longo, que deve passar por diversas etapas. Após a identificação de uma necessidade, como substituir um sistema biológico ou tratar uma condição, deve-se fazer o projeto do dispositivo, seguido de sua fabricação. Em seguida, o material deve passar por toda a caracterização físico-química, comum à preparação de todas as classes de materiais. Além disso, deve-se assegurar que o material produzido seja compatível à sua aplicação biológica. O requisito mínimo para utilização de qualquer biomaterial é a biocompatibilidade. Um material é considerado biocompatível se não causa reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente (BORELLI *et al.*, 2010).

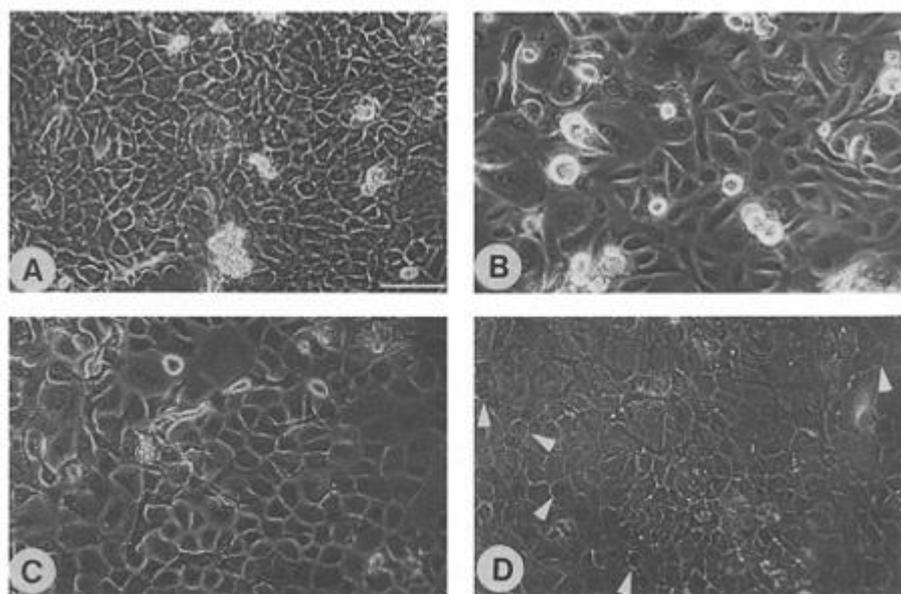
Além da biocompatibilidade, o material deve apresentar diversas outras propriedades adequadas à aplicação; materiais em contato com o sangue devem ser hemocompatíveis, não

induzindo coagulopatias; materiais implantáveis precisam ser capazes de se fixar ao tecido, evitando a formação de cápsula fibrosa de tecido conjuntivo, processo que pode levar à micro movimentações do implante; materiais removíveis, como lentes de contato, não podem aderir ao tecido adjacente, sendo passíveis de serem retirados a qualquer momento pelo usuário (RATNER *et al.*, 2013).

A realização de testes *in vitro* em biomateriais é uma etapa importante no processo de estabelecimento de um novo dispositivo ou material médico, e é realizada anteriormente aos ensaios *in vivo* utilizando modelos animais; esta metodologia pode ser considerada uma forma de “triagem” de materiais aptos ou não a prosseguirem para experimentos em animais (RATNER *et al.*, 2013). Nesse sentido, a utilização de células da linhagem de queratinócitos é uma abordagem experimental interessante para avaliar a citotoxicidade de materiais que podem ter uma potencial aplicação como curativo. Queratinócitos são células diretamente afetadas por lesões de pele, devido à sua vasta presença na epiderme humana. Após uma lesão, observa-se alterações nas proteínas do citoesqueleto destas células, bem como na expressão de receptores transmembrana (como as integrinas), levando a alterações na fisiologia dos queratinócitos, de um estado inativo, a um estado ativado e pró-inflamatório. Assim sendo, os queratinócitos adjacentes à lesão perdem suas propriedades adesivas e começam a migrar para diferentes sítios, de forma a iniciar a reparação da lesão, e as células que ficam no local começam a proliferar para substituir àquelas que migraram (JURÁNOVÁ *et al.*, 2017).

Dentre as linhagens de queratinócitos existentes, a linhagem HaCaT tem sido amplamente utilizada. As células HaCaT são queratinócitos imortalizados e não-tumorigênicos, com capacidade de diferenciação altamente conservada e elevada estabilidade genética. São assim denominadas pois seu processo de imortalização aconteceu em um meio de baixa concentração de íons Ca^{2+} e alta temperatura (cerca de 38,5 °C). As células HaCaT apresentam crescimento aderente, ou seja, sua proliferação é dependente de sua adesão a alguma superfície e são quase completamente preenchidas pelo núcleo, formando uma morfologia epidérmica característica (BOUKAMP *et al.*, 1988; SÁNCHEZ, 2014). A figura 7 ilustra os queratinócitos humanos normais da pele (painéis A e B), e uma das primeiras passagens das células HaCaT (painéis C e D).

Figura 7 - Queratinócitos humanos normais da pele e primeiras passagens das células HaCaT



Fonte: BOUKAMP *et al.* (1988).

Diversos estudos na literatura apontam o uso da linhagem HaCaT para avaliação do comportamento biológico de diferentes biomateriais. Lv *et al.* (2012) produziram materiais compósitos a partir de nanofibras de poli(caprolactona)(PCL)/gelatina contendo partículas biocerâmicas a base de silicato, a partir da técnica de eletrofição. Testes *in vitro* usando células HaCaT foram realizados para avaliar as propriedades biológicas do material. Os compósitos não apresentaram potencial citotóxico e permitiram a migração satisfatória de células HaCaT no seu interior. Além disso, testes *in vivo* indicaram aumento na regeneração tecidual, bem como na angiogênese, deposição de colágeno e diminuição da resposta inflamatória no local da lesão.

Kobiela *et al.* (2017) produziram membranas poliméricas, a partir de dois diferentes copolímeros (PGA-PLC-PLA e PGA-PLC), nos quais realizou-se modificação de superfície a partir de hidrólise na presença de NaOH. O efeito dessa modificação foi avaliado a partir de testes *in vitro* utilizando células HaCaT. Concluiu-se que o tratamento com NaOH aumentou a hidrofiliabilidade das membranas de PGA-PLC-PLA, bem como a sua rugosidade superficial, e os ensaios *in vitro* mostraram aumento na viabilidade celular, quando comparadas àquelas membranas não tratadas.

A literatura também registra estudos de extratos naturais em contato com células HaCaT. Li *et al.* (2016) estudaram o efeito de um óleo essencial chinês da espécie *Zanthoxylum*

bungeanum (ZB) nessas células. Este óleo apresenta atividades antitumorais, anti-inflamatórias e inseticidas, o que justifica o interesse de utilização deste extrato como possível tratamento para a psoríase, uma doença de pele que causa crescimento anormal de tecido epitelial. A partir de análise por cromatografia, identificou-se dentre os componentes presentes no óleo α -copaeno e cariofileno, que podem estar presentes também no óleo de copaíba. O monitoramento da quantidade de células viáveis foi feito a cada 24 horas num período de 6 dias, ao fim do qual a avaliação da viabilidade celular foi feita a partir de método colorimétrico. Concluiu-se que o componente principal do ZB, o D-limoneno, suprimiu o crescimento de células HaCaT, um bom resultado quando se busca um tratamento para psoríase.

Já o trabalho de Zulfakar *et al.* (2012) analisaram o efeito de óleo de peixe em conjunto com o dipropionato de betametasona no processo de proliferação de células HaCaT, a fim de averiguar o potencial para tratamento da psoríase. Observou-se que as células tratadas sofreram inibição em seu crescimento, sendo o tratamento com os dois compostos mais eficaz na supressão da proliferação celular, quando comparado ao tratamento somente com o dipropionato. Os efeitos anti-proliferativos do óleo de peixe ocorreram a partir da interrupção da síntese de DNA pelas células. Concluiu-se com o estudo, então, que o óleo de peixe, aliado ao dipropionato de betametasona é um bom candidato como tratamento tópico para doenças de pele como a psoríase.

Também é relatado na literatura a avaliação da citocompatibilidade do óleo de copaíba a partir de testes *in vitro* utilizando células HaCaT. Venturini *et al.* (2015) produziram nanopartículas para encapsulação de óleo de copaíba, para potencial uso no tratamento de carcinomas de pele. A biocompatibilidade das nanopartículas foi avaliada a partir de testes *in vitro* utilizando células HaCaT, e a viabilidade celular foi medida a partir de ensaio de MTT. As nanopartículas não apresentaram efeito citotóxico e o controle rígido da liberação da substância indica que este material é uma aposta promissora para o tratamento de câncer.

Devido à ampla utilização de células HaCaT para realização de testes *in vitro* com biomateriais, bem como de extratos naturais, propõe-se no presente trabalho a avaliação da citocompatibilidade dos filmes de poliuretano, com e sem óleo de copaíba, através de ensaios *in vitro* utilizando esta linhagem de células.

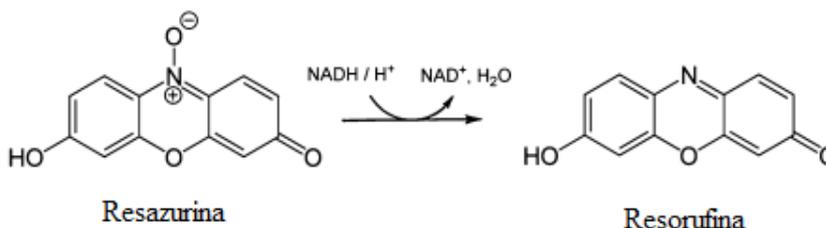
3.9. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

A escolha de um material para aplicação biológica, bem como suas etapas de produção, deve levar sempre em consideração sua biocompatibilidade. Para isso, deve-se criar maneiras

de avaliar o potencial citotóxico de biomateriais. A avaliação da toxicidade dos biomateriais pode ser realizada de maneira indireta, através de testes de viabilidade celular amplamente descritos na literatura, como a análise por Alamar Blue (RAMPERSAD, 2012). O ensaio com Alamar Blue constitui-se em um método simples, de poucas etapas e que não necessita de reagentes adicionais. Este método não altera o metabolismo e nem é tóxico às células permitindo o monitoramento contínuo do sistema; além disso, apresenta baixo custo em relação a outros métodos, e não ocorre a produção de substâncias tóxicas, desta forma os resíduos produzidos podem ser descartados no lixo comum (NILES *et al.*, 2008; NAKAYAMA *et al.*, 1997).

O teste de Alamar Blue® é projetado para medir quantitativamente o metabolismo mitocondrial de várias linhagens celulares, sejam elas humanas, animais, de bactérias ou fungos. O composto ativo deste ensaio é a resazurina, uma substância solúvel em água, estável em meio de cultura, não-tóxica e permeável às membranas celulares (RAMPERSAD, 2012). Em cultura de células metabolicamente ativas, a resazurina (coloração azul, não-fluorescente) é reduzida a resorufina (coloração rosa, fluorescente) por um conjunto de redutases derivadas da mitocôndria e do citosol. Desta forma, quanto maior o número de células viáveis, maior a formação de resorufina (STODDART, 2015). A figura 8 ilustra a reação de redução da resazurina.

Figura 8 – Reação de redução da resazurina à resorufina.



Fonte: Adaptado de Stoddart (2015).

Na respiração celular a resazurina age nas mitocôndrias como um acceptor intermediário de elétrons da cadeia transportadora de elétrons, sem interferir nos processos de transferência de elétrons, o que permite o monitoramento celular por longos períodos de tempo. (RAMPERSAD, 2012).

A mudança de um estado oxidado para outro reduzido nas moléculas permite a flexibilização de leitura por métodos colorimétricos (a partir da medida de absorbância por espectrofotometria) ou ainda por fluorescência. A absorbância por espectrofotometria deve ser

medida em dois comprimentos de onda (570 nm e 600 nm ou 540 nm e 630 nm), enquanto os sinais por fluorescência são medidos para comprimentos de onda de excitação entre 530-560 nm, e para comprimentos de onda de emissão a 590 nm.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS

Os materiais e reagentes empregados na produção dos filmes foram:

- *Pellets* de poliuretano termoplástico DELTHANE[®] E85 obtido da DELMAC DO BRASIL LTDA;
- Óleo de copaíba produzido na Reserva Extrativista Riozinho do Anfrísio em Altamira, Pará e gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Carolina Morelli (UNIFEI);
- N,N-Dimetilformamida (99,8%) (DMF) obtida da Synth[®].

Os meios de cultura utilizados para avaliação da esterilidade dos filmes de PU e para o ensaio de disco-difusão foram:

- Ágar Mueller Hinton;
- Caldo nutriente pH 7,0.

As bactérias Gram ⁺ *Bacillus subtilis* fornecidas pela Fiocruz com código de origem 110NaSR22 foram utilizadas para a realização do ensaio de disco-difusão.

Os materiais e reagentes empregados para o preparo de meios de cultura, utilizados para manutenção dos queratinócitos, bem como para a avaliação do potencial citotóxico dos filmes, foram:

- Garrafa para cultura celular de 75 cm² de Poliestireno obtida da SARSTEDT;
- Placa de cultura de 24 poços de Poliestireno obtida da SARSTEDT;
- Placa de cultura de 6 poços de Poliestireno obtida da SARSTEDT;
- *Coverslips* de 13 mm de diâmetro;
- *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) obtido da Sigma-Aldrich, com 0,2% v/v de gentamicina, sem adição de Soro Fetal Bovino (SFB) (DMEM_{inc}); ou com adição de 10% v/v de SFB obtido da Sigma Aldrich, 1% v/v de penicilina/estreptomicina obtido da Sigma-Aldrich (DMEM_{compl});
- Tampão fosfato-salino (PBS);
- Tripsina-EDTA obtida da Sigma Aldrich;
- Reagente Alamar Blue[™] obtido da Invitrogen[™].

4.3. PRODUÇÃO DOS FILMES DE PU

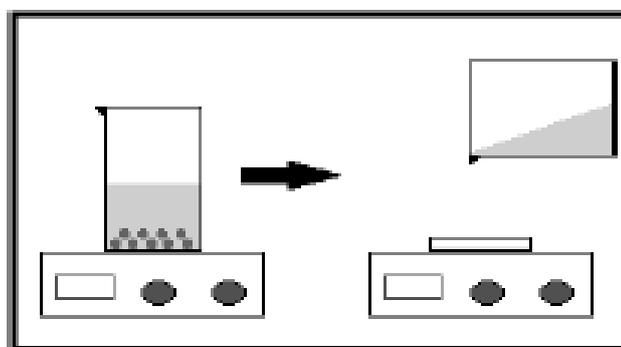
Os filmes de poliuretano foram produzidos a partir do método de evaporação de solvente, segundo metodologia estabelecida por MACHADO (2017).

4.3.1. Filmes de PU sem Óleo de Copaíba

Para a produção dos filmes de poliuretano sem adição de óleo de copaíba (PU_0), pesou-se os *pellets* de poliuretano em um béquer. Em seguida, adicionou-se ao béquer N,N-Dimetilformamida (DMF) de forma a obter uma concentração polimérica final de 7% m/v. Esta mistura foi tampada utilizando *parafilm*, de forma a evitar a evaporação do DMF; o conteúdo do béquer foi mantido sob agitação magnética (2 a 3 rpm) por 24 h a 40 °C, até ocorrer sua completa dissolução.

Após a dissolução completa do poliuretano em DMF, a solução resultante foi despejada em uma placa de petri de 100 x 15 mm. A placa de petri foi mantida aberta a 40 °C por 24h. A remoção do filme foi realizada com água destilada e uma pinça. O esquema do método de evaporação de solvente encontra-se demonstrado na figura 10.

Figura 10 – Esquema de processamento por evaporação de solvente.



Fonte: MACHADO, 2017.

Em seguida, os filmes foram cortados em discos circulares com diâmetros de 10 mm e 15 mm, utilizando um dispositivo extrator/vazador, construído conforme descrição no item 4.5.

4.3.2. Filmes de PU com Óleo de Copaíba

A produção dos filmes de PU com óleo de copaíba ($PU_{\text{óleo}}$) ocorreu de forma semelhante aos filmes sem óleo; entretanto, antes de adicionar o solvente DMF ao polímero foi acrescentado 30 % m/m de óleo de copaíba em relação à massa de PU. Os demais

procedimentos para a técnica de evaporação de solvente foram mantidos em relação à produção dos filmes sem óleo de copaíba.

4.4. FABRICAÇÃO DE UM DISPOSITIVO PARA CORTE DOS FILMES DE PU

Foram construídos dois dispositivos para o corte dos filmes de PU com diâmetros diferentes. A partir de um lingote de aço AISI 1060 de 30 mm de diâmetro foram feitos em um torno mecânico furos passantes de 10 e 15 mm.

O dispositivo de \varnothing 15 mm foi utilizado para obter um grande número de amostras, e por este motivo, foi submetido a tratamento térmico de têmpera, com o objetivo de aumentar a dureza do aço, prevenindo a perda de corte do dispositivo. Posteriormente foi realizado o revenimento para diminuir as tensões residuais causadas pelo resfriamento brusco da têmpera, diminuindo a fragilidade do material (CHIAVERINI, 1990).

O dispositivo de \varnothing 15 mm foi submetido ao tratamento térmico durante 2 horas em forno elétrico a 750 °C. Em seguida a têmpera foi realizada por imersão em óleo com agitação vigorosa. Após a têmpera, o revenimento foi feito a partir de aquecimento do material em forno elétrico a 250 °C por 1 hora, seguido de resfriamento ao ar. O dispositivo foi lixado manualmente, com lixas d'água e submetido a um processo de decapagem ácida, a partir de imersão em solução de ácido clorídrico 9,5 % (m/m), por 10 minutos.

Posteriormente foi realizado um processo de jateamento com microesferas de óxido de alumínio. Optou-se por lixar o dispositivo novamente após o jateamento, interna e externamente, com lixa d'água, e o auxílio de um torno mecânico. Finalmente, o dispositivo foi levado ao torno uma última vez, a fim de afiar sua ponta.

O dispositivo de \varnothing 10 mm foi produzido e afiado em ângulo, a fim de permitir o corte dos filmes. Neste dispositivo não foi realizado nenhum tratamento térmico.

O método de corte utilizado para os diâmetros de 10 mm e 15 mm, foi o mesmo: os filmes foram posicionados sobre uma folha de papel, em superfície rígida (mesa de madeira); em seguida, o dispositivo foi posicionado sobre o filme estendido, e foram aplicados esforços de compressão, manualmente, à medida que se girava o dispositivo. Após um giro de aproximadamente 360 ° as amostras foram cortadas no diâmetro apropriado.

4.5. ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES DE PU

Os filmes de PU foram esterilizados a partir de irradiação gama utilizando irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion no Canadá,

Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco.

Para os filmes de PU₀, foram utilizadas as seguintes doses de radiação: 2 kGy, 10 kGy, 15 kGy e 20 kGy; para os filmes de PU_{óleo}, utilizou-se 10 kGy e 15 kGy. A irradiação foi realizada no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), em Belo Horizonte, MG. A avaliação da esterilidade foi realizada a partir de um ensaio microbiológico nos filmes de PU₀.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.6.1. *Teste microbiológico para avaliação da esterilidade dos filmes de PU*

Filmes de PU₀ irradiados com as doses de 2 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy foram posicionados separadamente em uma placa de petri de 150 x 20 mm contendo 75 mL de Ágar Mueller Hinton. Utilizou-se filmes não irradiados como controle positivo. As placas foram incubadas a 35 °C em estufa incubadora Quimis (Q316M4) e o crescimento de microrganismos avaliado após 24 h, 48 h e 72 h de incubação.

4.6.2. *Microscopia Eletrônica de Varredura*

A análise superficial dos filmes de PU foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de varredura de bancada *Shimadzu*, modelo SSX-550. Devido ao comportamento isolante elétrico dos materiais poliméricos, utilizou-se fita de carbono, e o material foi recoberto com ouro em corrente de 1,5 mA por 3 minutos, na metalizadora da marca *Sanyu Electron*, modelo *SC-701*, de maneira a aumentar a condutividade das amostras. Para os filmes de PU₀, foram avaliadas as amostras não irradiadas, e com as doses de 10 kGy, 15 kGy e 20 kGy; para os filmes de PU_{óleo}, avaliou-se as amostras irradiadas com as doses de 10 kGy e 15 kGy.

4.7. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em células da linhagem HaCaT, e o potencial citotóxico dos filmes foi observado a partir do ensaio de Alamar Blue.

4.7.1. *Manutenção das Células em Cultura*

Durante a realização dos ensaios, as células HaCaT foram mantidas em cultura em garrafa de cultura celular de poliestireno de 75 cm², em DMEM_{compl.} A ressuspensão celular, quando

necessária, foi feita com tripsina-EDTA. As células foram mantidas em estufa da marca *Sanyo*, modelo MCO-17AC, a 37 °C, em atmosfera com 5% CO₂.

4.7.2. Avaliação da viabilidade celular

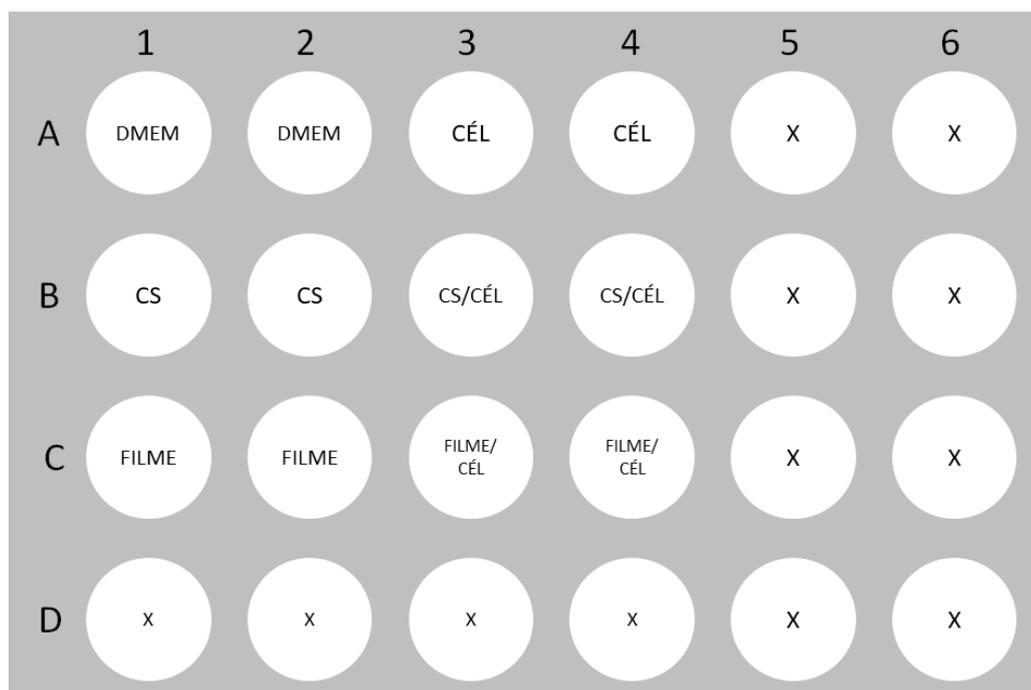
A viabilidade das células HaCaT em contato direto com filmes de PU foi avaliada a partir do ensaio de Alamar Blue utilizando duas abordagens experimentais distintas. No primeiro procedimento utilizou-se placas de 24 poços, e no segundo procedimento placas de 6 poços.

Nos dois delineamentos foram utilizadas *coverslips*, discos de vidro de diâmetro similar aos filmes e que foram utilizadas como controle negativo, devido à conhecida biocompatibilidade deste material, e também pela capacidade que as células têm em aderir à sua superfície (KOBIELA *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2016).

Avaliação da viabilidade e adesão celular em filmes de PU₀

Primeiramente, em poços selecionados da placa de cultura de 24 poços, foram posicionadas *coverslips* previamente esterilizadas em micro-ondas, durante 5 minutos. Em seguida, os filmes de PU₀ esterilizados com 15 mm de diâmetro foram posicionados nos poços apropriados, assim como apresentado na figura 11.

Figura 11 - Desenho esquemático da posição das amostras na placa de 24 poços.



CS: *coverslip*; CÉL: células; X: poço vazio.

Fonte: Próprio autor.

As células foram lavadas com PBS e tripsinizadas, para ressuspensão na garrafa de cultura; a concentração celular foi obtida a partir de contagem em câmara de Neubauer. Em cada poço, foram depositadas 1×10^5 células em suspensão em um volume final de 500 μL de DMEM_{compl}. As células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. Após este período, a morfologia e crescimento celular nos poços foram observados com o auxílio de microscópio óptico EVOS XL Core Imaging System.

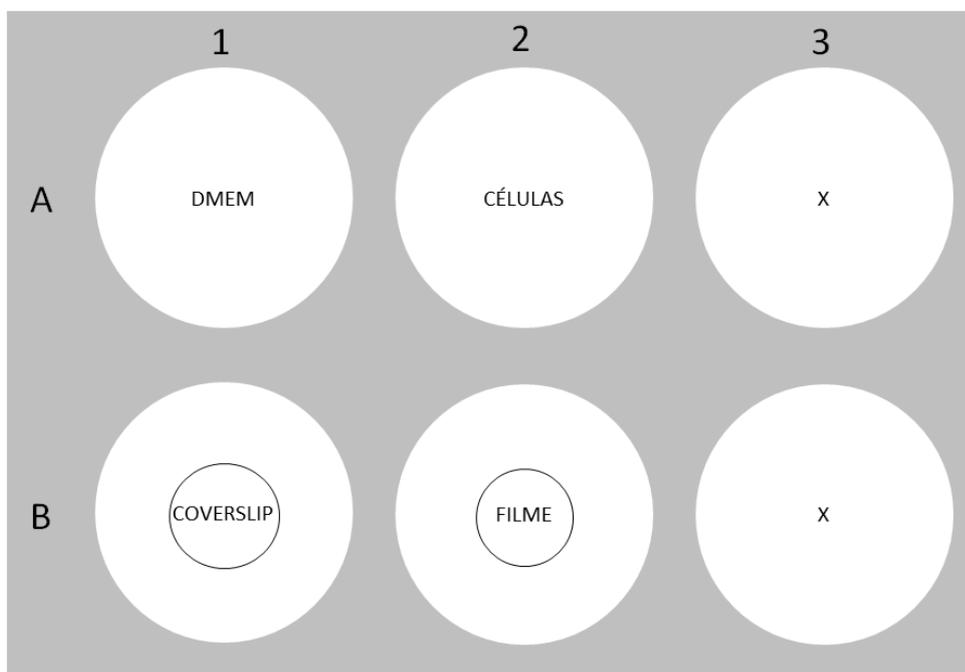
Em seguida, o conteúdo dos poços foi retirado, e foi adicionada uma solução contendo 90% v/v de DMEM_{inc} e 10% v/v de Alamar Blue, em um total de 500 μL por poço. As células foram incubadas por 3 h, a 37 °C e 5% CO₂, protegidas da luz. Em seguida, foram retirados 100 μL do sobrenadante de cada poço, e colocados em novos poços, em duplicata, em uma placa de 96 poços, para leitura. Os valores de fluorescência foram lidos a 540/590 nm (excitação/emissão) no Fluorímetro Varioskan® Flash da Thermo Scientific. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo, os poços contendo apenas células, o qual foi considerado como contendo 100% de células viáveis. Os poços sem células (as duas primeiras colunas da placa de 24 poços) foram utilizados como branco do experimento. Os resultados obtidos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Avaliação da viabilidade celular por contato direto

Neste ensaio de contato direto as células HaCaT foram adicionadas aos poços anteriormente ao posicionamento dos filmes e *coverslips*. Foram utilizados filmes de PU₀ de 10 mm de diâmetro devidamente esterilizados.

As células HaCaT foram lavadas com PBS e tripsinizadas, para ressuspensão na garrafa de cultura; a concentração celular foi obtida a partir de contagem em câmara de Neubauer. Em cada poço foram depositadas 5×10^5 células em um volume final de 2 mL de DMEM_{compl}. As células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ até atingir 80% de confluência. Em seguida, retirou-se o meio dos poços, o filme de PU e a *coverslip* foram posicionados na placa, conforme ilustrado na Figura 12, e adicionou-se novamente DMEM_{compl}. As células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. A observação celular após o período de incubação foi também realizada por microscopia óptica.

Figura 12 - Desenho esquemático da posição das amostras na placa de 6 poços.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, o conteúdo dos poços foi retirado, e foi adicionada uma solução contendo 90% v/v de DMEM_{inc} e 10% v/v de Alamar Blue, em um total de 1 mL por poço. O potencial citotóxico dos filmes de PU foi avaliado a partir do ensaio de Alamar Blue, conforme descrito anteriormente. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo, o poço contendo apenas células, o qual foi considerado como contendo 100% de células viáveis. O

poço não contendo células (indicado como DMEM) foi utilizado como branco do experimento. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Um ensaio preliminar na placa de 6 poços utilizando o mesmo delineamento experimental descrito foi realizado com amostras de PU_{óleo} devidamente esterilizadas.

4.8. ENSAIO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

A avaliação do potencial antimicrobiano do óleo de copaíba foi realizada a partir do teste de disco-difusão em ágar. Para a análise, discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro embebidos em óleo de copaíba foram utilizados.

Amostras da cultura líquida de *Bacillus subtilis* na fase de crescimento exponencial foram distribuídos em placas de petri de 150 x 20 mm contendo o meio de cultura Ágar Mueller Hinton. Em seguida, os discos de papel embebidos em óleo de copaíba foram posicionados na superfície da placa de cultivo. As placas foram incubadas em estufa à 35 °C por 18 h, para subsequente verificação dos halos de inibição, área da placa de cultivo sem crescimento visível dos microrganismos a olho nu, em torno do material teste (ANVISA M2-A7).

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

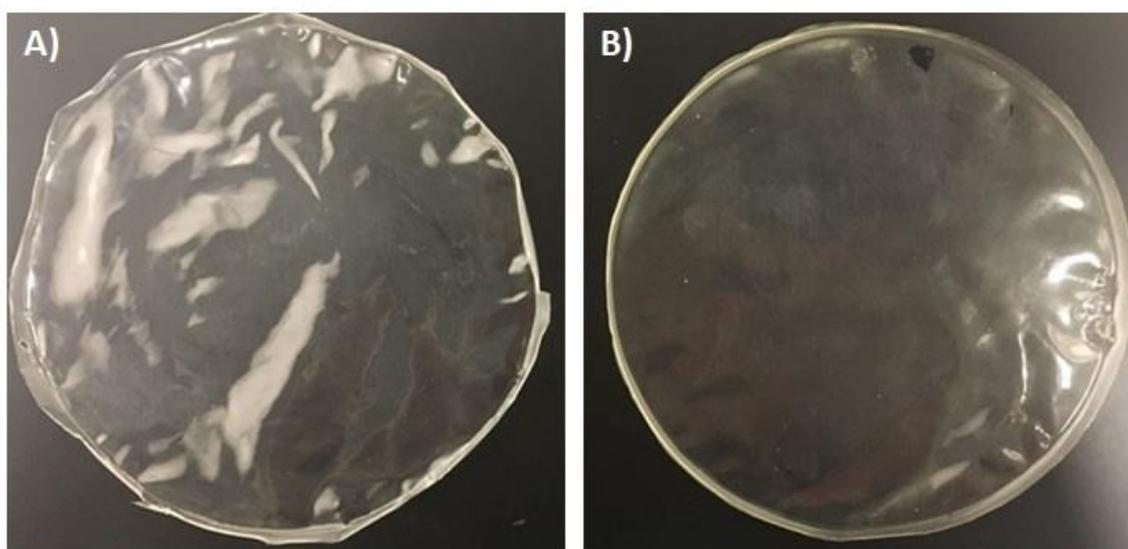
A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism 7.4*. Os dados foram expressos como a média das réplicas e desvio padrão (DP), e analisados utilizando *two-way* ANOVA a um nível de significância de $p < 0,05$. A diferença entre os fatores foi analisada por teste de Tukey, e valores $p < 0,05$ foram considerados como diferença estatisticamente significativa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DOS FILMES DE PU

Os filmes de PU₀ produzidos a partir da técnica de evaporação de solvente apresentaram-se homogêneos, lisos, transparentes e finos (com espessura aproximada de 0,20 mm), como pode ser visualizado na figura 13, painel A. Os filmes de PU_{óleo} apresentaram superfície e espessura similares aos filmes de PU₀, exibindo, porém, superfície translúcida, em tons ligeiramente mais amarelados, em relação aos filmes de PU₀ (figura 13, painel B).

Figura 13 – Filmes de PU sem e com óleo de copaíba



Fonte: Próprio Autor.

A técnica de evaporação de solvente é um processamento amplamente utilizado em materiais poliméricos, pois, permite a produção de filmes finos, flexíveis, transparentes e homogêneos, características que são importantes para aplicação desses materiais como curativos (BOATENG *et al.*, 2013). No entanto, uma desvantagem da técnica é a possibilidade de não evaporar completamente o solvente, que pode ser um material tóxico para as células.

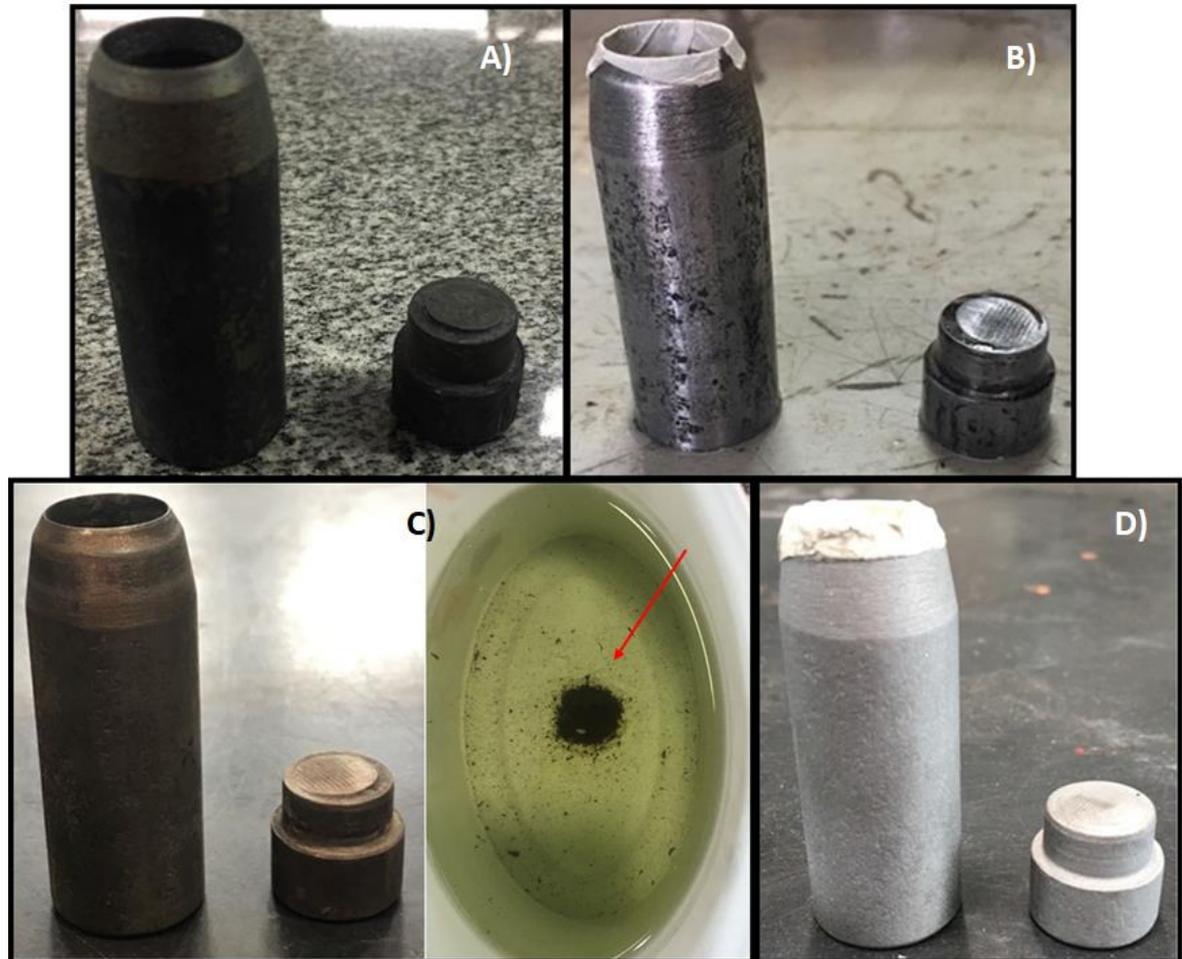
Após a produção dos filmes, para sua caracterização biológica, foi necessário cortá-los em formato de discos e, devido à alta elasticidade do material não foi possível o corte com tesoura ou instrumentos similares. Por isso, foi necessário fabricar instrumentos de corte metálicos, específicos para este fim.

5.2. FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS PARA CORTE DOS FILMES DE PU

A figura 14, painel A, ilustra o dispositivo Ø 15 mm após o tratamento de têmpera e revenimento. Observa-se uma grossa camada superficial de óxido, resultado da exposição do aço à alta temperatura. Após o tratamento térmico, foi necessária a limpeza superficial do material, de forma a se remover a camada óxida formada. Após ser lixado manualmente, foi possível remover uma parte da camada de óxido, mas o material ainda apresentava muitos traços de oxidação, como é possível observar na figura 14, painel B. Neste estado, partículas de corrosão poderiam ser transferidas para o filme durante o corte, interferindo nos resultados dos ensaios de viabilidade celular.

Em tentativas de remover a camada de óxido restante, foi realizada, em seguida, a decapagem ácida; após este procedimento, o dispositivo adquiriu aspecto mais fosco, como visto na figura 14, painel C; foi possível observar a eliminação de quantidade significativa de partículas de corrosão, mas o material ainda não se encontrava totalmente limpo. Desta forma, optou-se por realizar o jateamento; após esta etapa, o dispositivo adquiriu uma superfície brilhante, como consequência da deposição do material abrasivo na superfície do dispositivo, o que é observado na figura 14, painel D. Porém, a superfície do dispositivo não se encontrava homogênea, e a presença de abrasivo no dispositivo poderia causar deposição deste nos filmes de PU, o que poderia alterar a citocompatibilidade dos filmes. O dispositivo foi então novamente lixado, com auxílio de torno mecânico e lixa d'água, e ao final do processo, adquiriu aparência brilhante, e livre de partículas de oxidação, conforme é possível observar na figura 15.

Figura 14 – Aparência do dispositivo de corte de diâmetro 15 mm após tratamento térmico e diferentes processamentos para limpeza superficial.



Dispositivo de corte após: A) tratamento térmico. B) Lixamento manual com lixa d'água. C) Decapagem ácida (Seta indica o material removido após imersão). D) Jateamento com material abrasivo.

Fonte: Próprio Autor.

Figura 15 – Aparência do dispositivo de corte de diâmetro 15 mm após lixamento com auxílio de torno mecânico.



Fonte: Próprio Autor.

Finalmente, o dispositivo foi levado ao torno uma última vez, a fim de afiar sua ponta, uma vez que os processamentos anteriores levaram o dispositivo a perder o corte. Ao final do processo, foi possível obter um dispositivo afiado, de superfície polida e livre de partículas de oxidação.

Já o dispositivo de corte fabricado com diâmetro interno de 10 mm não passou por tratamento térmico, tendo em vista que o número de amostras necessárias com \varnothing 10 mm seria consideravelmente menor em relação à quantidade de amostras com \varnothing 15 mm. Portanto, a perda de corte com o uso não seria um problema e este dispositivo foi somente afiado (Figura 16).

Figura 16 - Dispositivo de corte de diâmetro 10 mm confeccionado.

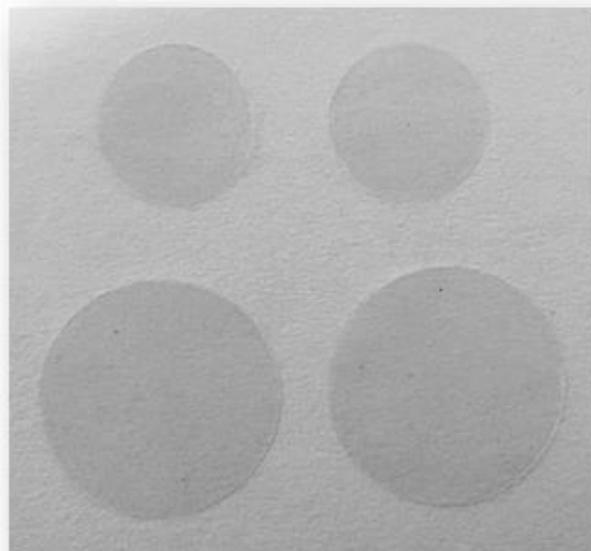


Fonte: Próprio Autor.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

A partir dos instrumentos de corte confeccionados, foram obtidos discos de PU em diâmetros de 10 mm e 15 mm (Figura 17).

Figura 17 – Filmes de PU cortados em diâmetros de 10 e 15 mm.



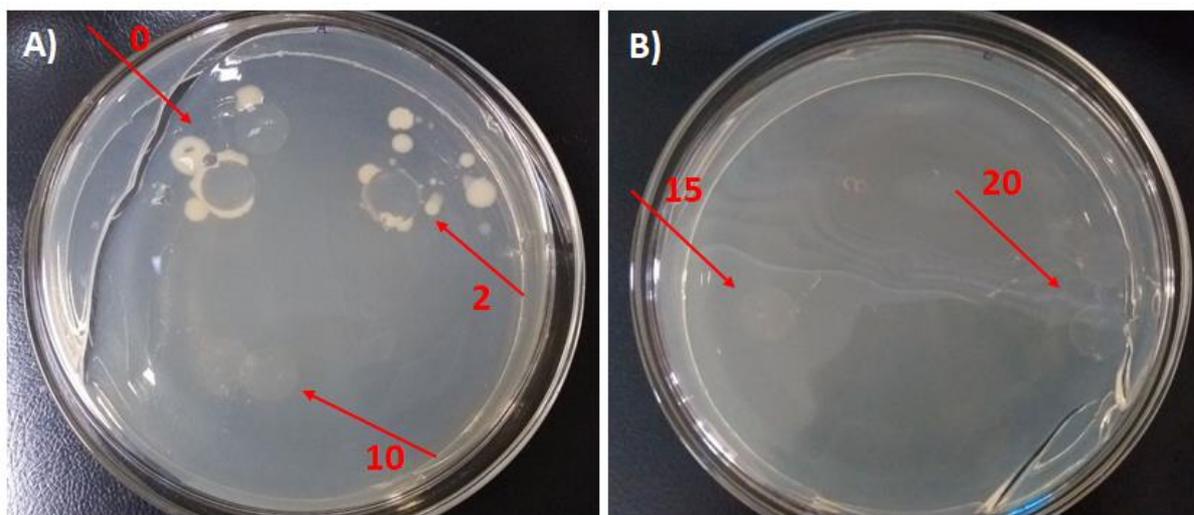
Fonte: Próprio Autor.

Os discos de 15 mm foram submetidos à irradiação gama nas doses de 2 KGy, 10 KGy, 15 KGy e 20 KGy. Após a irradiação, os discos foram caracterizados a partir de teste microbiológico e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os discos de 15 mm foram levados para os ensaios de viabilidade e adesão celular na placa de 24 poços, enquanto os discos de 10 mm, utilizados nos ensaios de contato direto na placa de 6 poços.

5.3.1. Teste microbiológico para avaliação da esterilidade dos filmes de PU₀

Os resultados do teste para avaliação da esterilidade de filmes de PU₀ irradiados com diferentes doses de radiação gama são apresentados nas figuras 18, 19 e 20 a seguir. Após 24 h de incubação a 35 °C (figura 18), foi possível observar o crescimento microbiano ao redor dos filmes não irradiado (0 KGy) e irradiados com 2 KGy. Após 48 h e 72 h de incubação, figuras 19 e 20, respectivamente, observou-se o aumento progressivo de microrganismos nos filmes não irradiado e irradiado com 2 KGy. No entanto, para as amostras irradiadas com as doses de 10 KGy, 15 KGy e 20 KGy, não foi observado nenhum crescimento microbiano após 72 h de ensaio. Desta forma, é possível inferir que doses de radiação de pelo menos 10 KGy são necessárias para a esterilização efetiva dos filmes de PU₀.

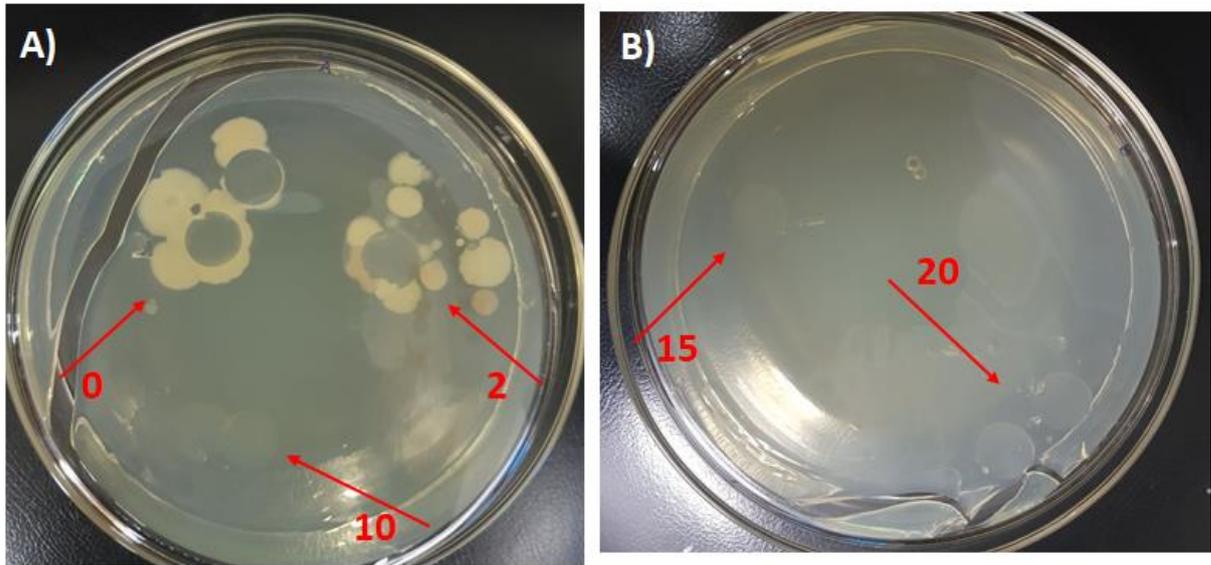
Figura 18 – Filmes de PU₀ irradiados e não irradiado após 24 h



A) Placa contendo filmes não irradiado (0 KGy), e irradiados com doses de 2 KGy e 10 KGy. B) Placa contendo filmes irradiados com doses de 15 KGy e 20 KGy. Setas indicam a posição dos filmes.

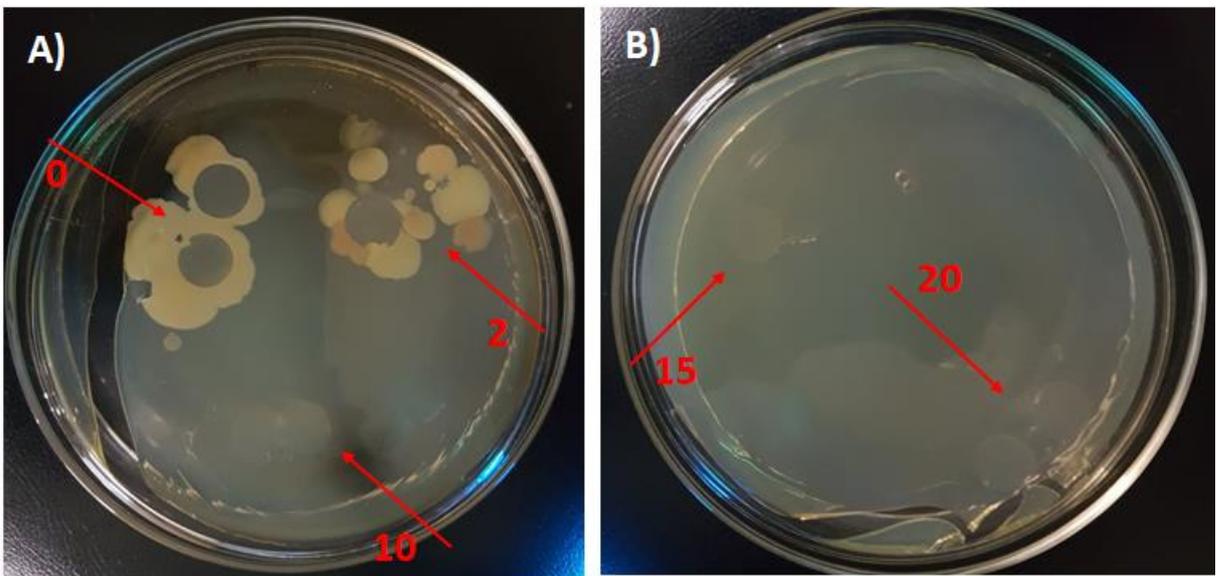
Fonte: Próprio Autor.

Figura 19 – Filmes de PU₀ irradiados e não irradiado após 48 h



A) Placa contendo filmes não irradiado (0 KGy), e irradiados com doses de 2 KGy e 10 KGy.
 B) Placa contendo filmes irradiados com doses de 15 KGy e 20 KGy.
 Fonte: Próprio Autor.

Figura 20 – Filmes de PU₀ irradiados e não irradiado após 72 h



A) Placa contendo filmes não irradiado (0 KGy), e irradiados com doses de 2 KGy e 10 KGy.
 B) Placa contendo filmes irradiados com doses de 15 KGy e 20 KGy.
 Fonte: Próprio Autor.

Foi possível observar o aparecimento de rachaduras no meio de cultura, que são provavelmente devidas ao ressecamento após períodos prolongados de incubação a 35 °C; isso pode ser adicionalmente corroborado pelo aumento na extensão dessas fendas com o passar do tempo.

A esterilização de materiais por irradiação gama é validada por norma internacional; e geralmente, estabelece-se que a dose mínima de 25 KGy seja aplicada; se, no entanto, por alguma razão, for necessária a utilização de outra dose, deve-se realizar um exercício de estabelecimento da dose que envolva a esterilização, e sua posterior verificação (BAUME *et al.*, 2016; MUSSEL *et al.*, 2018).

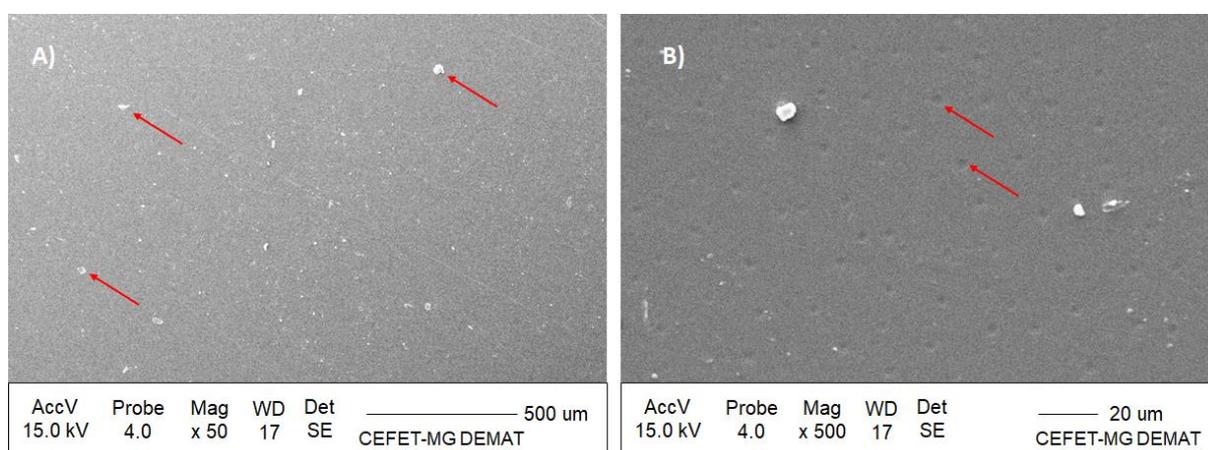
No cenário da produção dos filmes nesse trabalho, não foi possível observar crescimento microbiano em ágar para doses de radiação gama de pelo menos 10 KGy; desta forma, pode-se considerar que a dose mínima esterilizante de radiação gama para os filmes de PU, nestas condições, é de 10 KGy.

Após tomar conhecimento das doses de radiação gama capazes de esterilizar os filmes de PU, é importante saber se este processo induziu alterações superficiais nos filmes, tendo em vista que, quanto maior a dose de radiação, maior a confiabilidade do processo de esterilização, porém maior a probabilidade de alterações nas cadeias poliméricas.

5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o teste microbiológico de avaliação da esterilidade dos filmes, os discos de PU irradiados, foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como a dose mínima de radiação que levou à esterilização eficaz dos filmes foi de 10 KGy, as imagens de MEV foram realizadas nos filmes de PU₀ irradiados a partir desta dose, e nos filmes de PU não irradiados para comparação. A figura 21 apresenta as imagens obtidas por MEV para o filme de PU₀ não irradiado.

Figura 21 – Filme de PU₀ não irradiado.



Fonte: Próprio Autor.

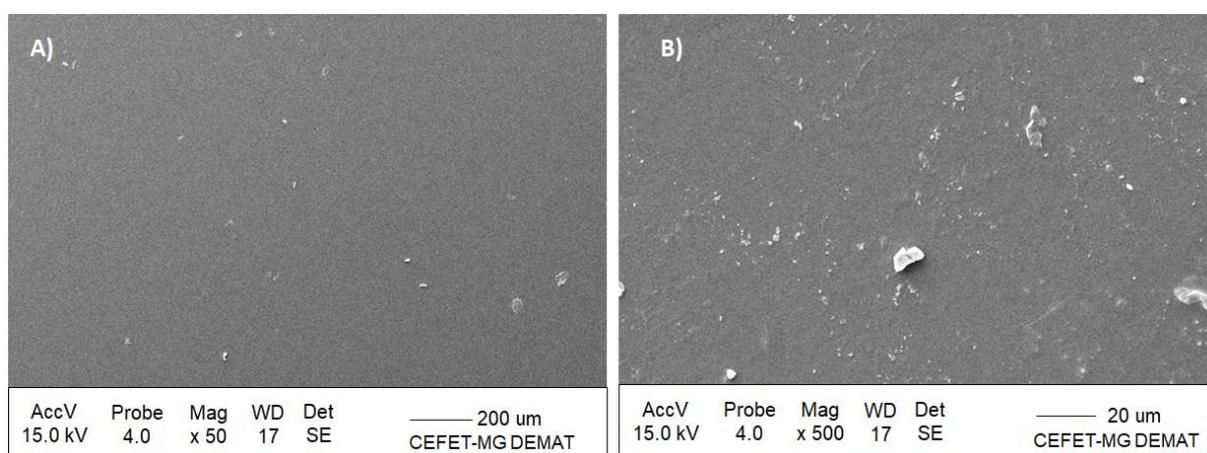
Observa-se uma superfície relativamente homogênea e contínua no filme de PU₀ não irradiado, com a presença de pequenos pontos brancos, que podem ser fragmentos de *pellets* poliméricos, que não foram completamente dissolvidos durante o processo de fabricação do filme (setas - figura 21, painel A). Também é possível observar a presença de reentrâncias, que podem ter sido ocasionadas pela evaporação rápida do solvente (setas – figura 21, painel B). A alteração de alguns parâmetros de produção, como aumentar a temperatura utilizada para dissolução, aumentar a frequência de agitação magnética, ou ainda, aumentar o tempo para dissolução, podem levar a uma melhor dissolução do PU, com consequente melhoria nas características superficiais do filme produzido. Além disso, durante o curso de produção dos filmes, foi possível notar que as condições ambientais influenciam nas características finais do filme produzido; por exemplo, dias com maior umidade prejudicam a evaporação do solvente, gerando um material mais opaco, provavelmente devido à presença de DMF na estrutura; essas amostras não foram utilizadas para nenhuma das análises.

O uso de N,N-Dimetilformamida (DMF) é relatado como um bom solvente para poliuretanos (MASIUK & RAKOCZY, 2009; GORNA & GOGOLEWSKI, 2003). A literatura aponta também a vasta produção de filmes poliméricos a partir de evaporação de solvente (DENG *et al.*, 2018). Leones *et al.*, (2017) produziram filmes de gelatina e siloxano para aplicações biomédicas, a partir da técnica de evaporação de solvente. Os filmes eram finos (espessura < 0,3 mm), flexíveis, e apresentaram superfície transparente, lisa e homogênea, conforme observado por microscopia eletrônica.

Machado (2017) produziu, a partir da mesma técnica, filmes de PU, sendo que os filmes apresentaram aparência menos homogênea, porém com menor número de partículas, além da presença de poros abertos, e bolhas indicativas da evaporação ineficaz do solvente orgânico. Este trabalho, no entanto, utilizou *pellets* de PU provenientes de diferentes matérias-primas (poliol poliéster, enquanto que para o presente trabalho, tratou-se de um poliol poliéter); a presença de grupos éster implica que, para cada monômero, existe um grupo COO⁻ dentro da cadeia polimérica principal, enquanto que um grupo éter significa a presença de um O²⁻ entre carbonos na cadeia principal. Essas diferenças podem ter levado a diferentes interações entre polímero e solvente, o que proporcionou melhor dissolução polimérica em solvente orgânico DMF para Machado (2017), e ao mesmo tempo, maior dificuldade de evaporação do solvente observada, devido à interação química. Por isso, para os mesmos parâmetros de fabricação, podem ter sido observadas características superficiais distintas.

A superfície do filme de PU₀ irradiado com 10 KGy pode ser observada na figura 22. Não foram observadas diferenças superficiais significativas com relação ao filme não irradiado. Além disso, é importante notar que foram observadas diferenças na superfície de regiões mais centrais do filme (figura 22, painel A), com relação à outra mais periférica (figura 22, painel B); quanto mais afastado do centro da amostra, maior a presença de fragmentos de polímero não dissolvido. Uma possível explicação é que o aquecimento proporcionado pelo prato não é uniforme, apresentando maior intensidade no centro em relação as bordas.

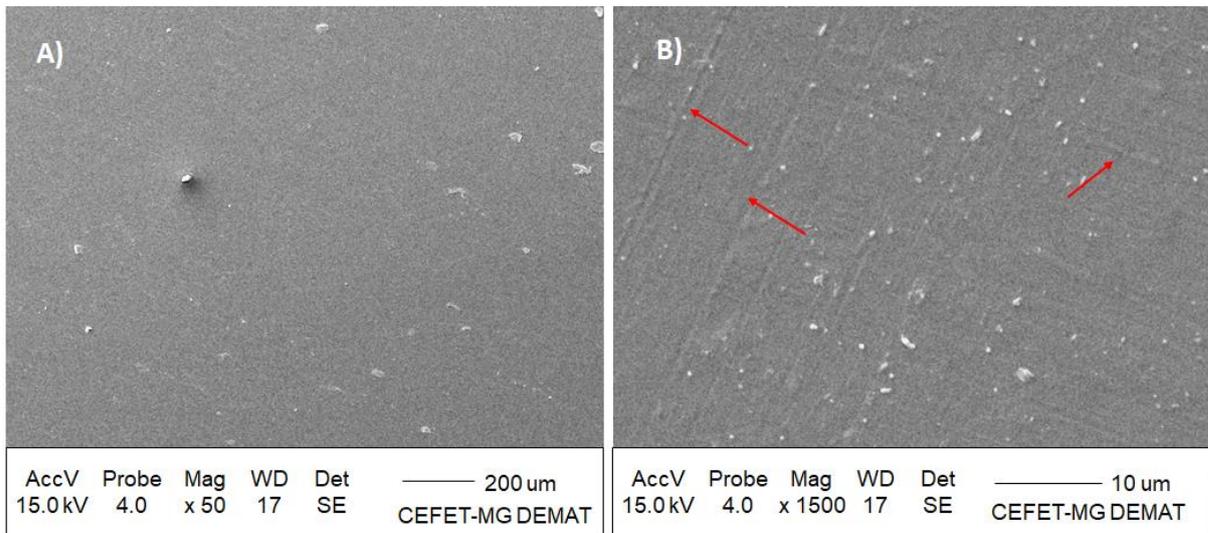
Figura 22 – Filme de PU₀ irradiado com 10 KGy.



Fonte: Próprio Autor.

As imagens do filme de PU₀ irradiado com 15 KGy, apresentadas na figura 20, também não apontaram diferenças superficiais significativas com relação ao filme não irradiado. O mesmo padrão de diferenças entre regiões mais centrais (painel A) e mais periféricas (painel B) foi observado; quanto mais afastado do centro da amostra, maior a presença de fragmentos de polímero não dissolvido. Além disso, foi possível observar linhas diagonais (setas) que podem ter sido originadas a partir do contato com a superfície da placa de petri utilizada para evaporação do solvente.

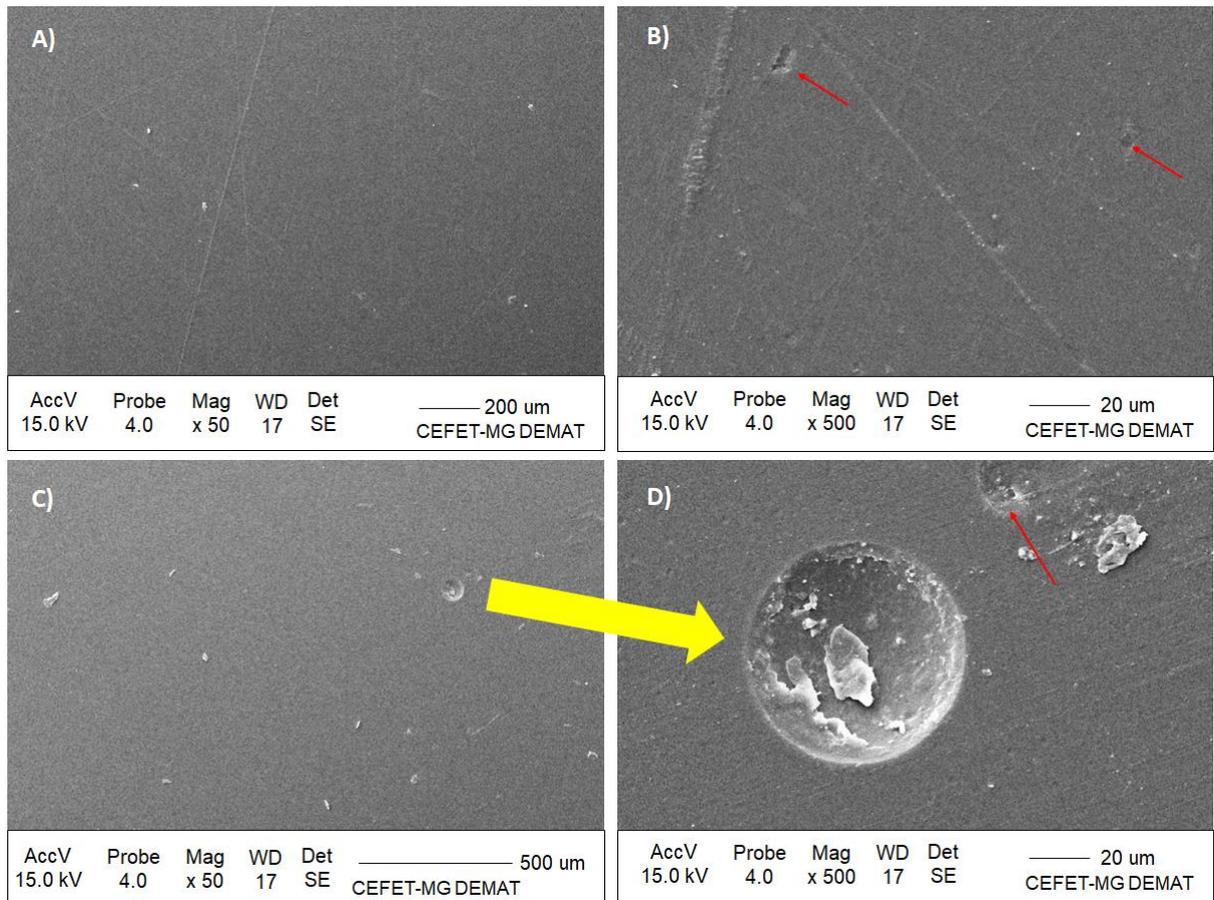
Figura 23 – Filme de PU₀ irradiado com 15 KGy.



Fonte: Próprio Autor.

O filme irradiado com 20 KGy, por sua vez, apresentou inúmeras alterações superficiais indicativas de degradação polimérica, conforme indicado na figura 24 (setas vermelhas). As indicações de degradação polimérica se mostraram visualmente semelhantes a fissuras e descamações superficiais (figura 24, painéis B, C e D). O painel D é um aumento da região indicada no painel C (seta vermelha), e representa uma região na qual foram observados indícios de degradação superficial polimérica.

Figura 24 – Filme de PU₀ irradiado com 20 KGy.



Fonte: Próprio Autor.

O objetivo principal da realização de microscopia eletrônica foi identificar a maior dose de radiação tolerável pelas amostras, de forma a não acarretar em alterações superficiais do filme, indicativas de degradação polimérica. Desta forma, após analisar as imagens de microscopia eletrônica dos filmes de PU₀, é possível inferir que a dose de radiação de 20 KGy causa possível degradação superficial polimérica e, por isso, 15 KGy é a dose máxima de radiação gama na qual as amostras de PU₀ produzidas com a metodologia descrita podem ser expostas.

O método de esterilização por radiação gama é ideal para itens de uso único, e materiais com baixa estabilidade térmica, como é o caso de materiais poliméricos, que apresentam baixa temperatura de fusão, e é amplamente utilizado na indústria. A radiação gama é uma forma de radiação eletromagnética de alta energia e penetração, que pode passar pela maioria das barreiras físicas e desnaturar proteínas e ácidos nucleicos, desativando qualquer tipo de microrganismo presente no material (BAUME *et al.*, 2016).

O estudo da esterilização de polímeros a partir de irradiação gama é descrita na literatura para embalagens poliméricas de uso único (PORTO *et al.*, 2018; Gaston *et al.*, 2018), e dispositivos médicos. Gorna & Gogolewski (2003) avaliaram o efeito da radiação gama na estabilidade molecular e propriedades mecânicas de diferentes poliuretanos biodegradáveis para aplicações médicas. A dose de radiação utilizada neste trabalho foi de 25 KGy; os polímeros irradiados apresentaram degradação em diferentes níveis, o que foi demonstrado por reduções em propriedades mecânicas. Os autores observaram reduções de massa molar de até 50%, reduções na resistência à tração e módulo de elasticidade; imagens obtidas por MEV indicaram alterações superficiais nos poliuretanos com caráter mais hidrofílico, e a rugosidade média (Ra) das amostras tendeu a aumentar após a irradiação. A partir de análise por FTIR, foi possível observar que houve quebra das cadeias poliméricas a partir das ligações uretano.

A resposta dos materiais poliméricos à radiação gama é altamente dependente, no entanto, de sua estrutura química. Akter *et al.* (2012) demonstraram queda superior a 50% da resistência à tração em filmes de quitosana após irradiação com 25 KGy pode ser atribuída à quebra de cadeias poliméricas. Um outro filme, no mesmo estudo, composto de quitosana + amido + diacrilato de 1,4-butilenoglicol (BDDA), apresentou comportamento bastante diferente: à dose de 25 KGy, sua resistência a tração aumentou em mais de 50%, o que pode ser atribuído à grafitação do BDDA à quitosana e amido.

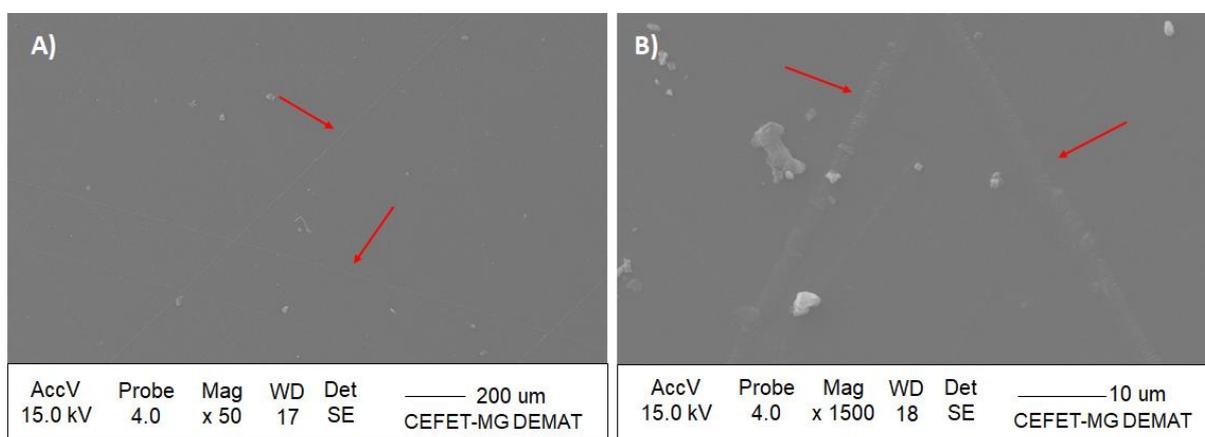
Como a dose padrão de esterilização a partir de radiação gama é de 25 KGy, muitos estudos de irradiação polimérica por raios gama documentam apenas as alterações exibidas a partir de doses muito mais altas (acima de 50 KGy). Burillo *et al.* (2013) avaliaram a degradação de poliuretanos aromáticos a partir de irradiação gama com até 1000 KGy, sendo possível observar grande redução na resistência à tração (~40%) com a dose de 200 KGy, bem como perda progressiva da ductilidade do material. Foi observado que a alta tolerabilidade destes poliuretanos à radiação foi devida à capacidade de estabilização dos radicais formados na cadeia pelos grupos diacetilenos aromáticos adicionados, impedindo a quebra de cadeias poliméricas, bem como o acontecimento de ligações cruzadas. Conforme mencionado anteriormente, conhecer a estrutura química e molecular polimérica é de alta relevância, para desvendar possíveis alterações estruturais após o processo de irradiação gama.

Desta forma, a radiação gama pode ser considerada uma forma eficiente de esterilização polimérica, de forma geral, mas deve-se primeiro averiguar a resistência do polímero a este método. Para o presente trabalho, indica-se que a dose de 15 KGy foi suficiente para esterilização eficaz de filmes de PU₀, sem causar alterações superficiais observáveis por

microscopia eletrônica, e foi a dose escolhida para esterilização dos filmes de PU₀ para subsequentes ensaios biológicos.

As amostras de PU_{óleo} foram também caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, e os resultados são apresentados nas figuras 25,26 e 27 a seguir. Como a dose de 20 KGy utilizada nos filmes de PU₀ levou a degradação polimérica, para os filmes de PU_{óleo} esta dose foi descartada. A figura 25 apresenta as imagens de microscopia eletrônica obtidas para o filme PU_{óleo} não irradiado.

Figura 25 – Filme de PU_{óleo} não irradiado.



Fonte: Próprio Autor.

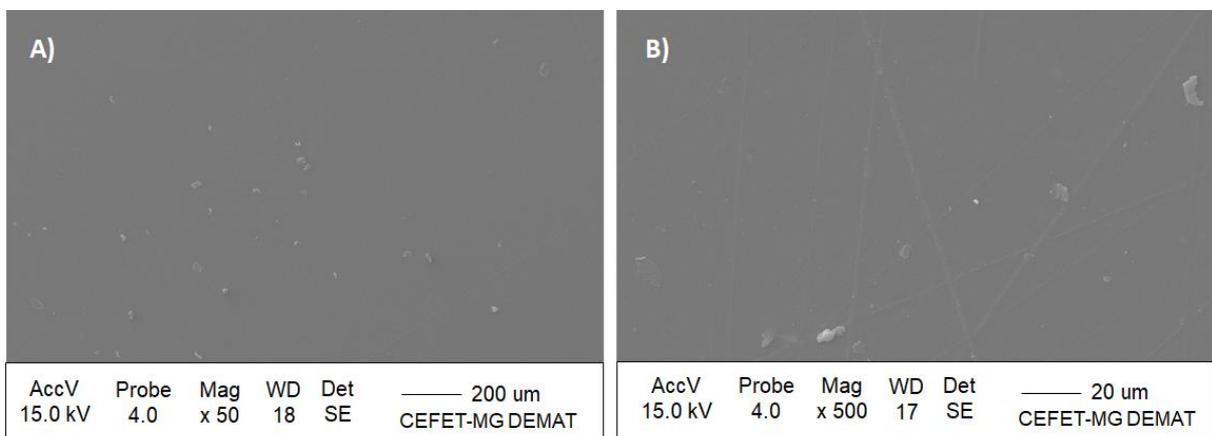
Foram encontradas na superfície destes filmes listras semelhantes às aquelas observadas nos filmes de PU₀ (setas), provavelmente originadas a partir de imperfeições de superfície da placa de petri utilizada para evaporação do solvente. Em termos gerais, a superfície é semelhante à superfície do filme de PU₀; lisa, bastante homogênea, porém com a presença de menos protuberâncias, um indicativo que a dissolução dos *pellets* ocorreu de forma mais eficaz. Esse fenômeno pode ser devido ao posicionamento do óleo entre cadeias poliméricas, causando o aumento do volume livre e geração de uma cadeia ‘inchada’, etapa fundamental para a solubilização verdadeira de um polímero (CANEVAROLO, 2006), o que leva a uma superfície de filme mais lisa e homogênea para os filmes de PU_{óleo}, em comparação aos filmes de PU₀.

A consequência da adição de moléculas orgânicas a filmes poliméricos é relatada na literatura. Deng *et al.* (2018) produziram filmes de gelatina e gelatina + zeína para aplicações biomédicas, a partir da técnica de evaporação de solvente. Macroscopicamente, ambos os filmes apresentaram superfície semi-transparente, lisa e homogênea. A partir de imagens obtidas por MEV, foi possível observar que os filmes de gelatina apresentaram inúmeros poros, devido à

evaporação do solvente; enquanto que os filmes de gelatina + zeína exibiram superfície mais homogênea, com menor número de poros, e de menores diâmetros. De acordo com Natu *et al.* (2003), quanto maior a agregação intra-molecular das cadeias poliméricas, maior a dificuldade de evaporação do solvente, levando então à criação de poros.

Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica do filme de PU_{óleo} irradiado com 10 KGy (figura 26), não foi possível visualizar diferenças superficiais significativas com relação ao filme de PU_{óleo} não irradiado.

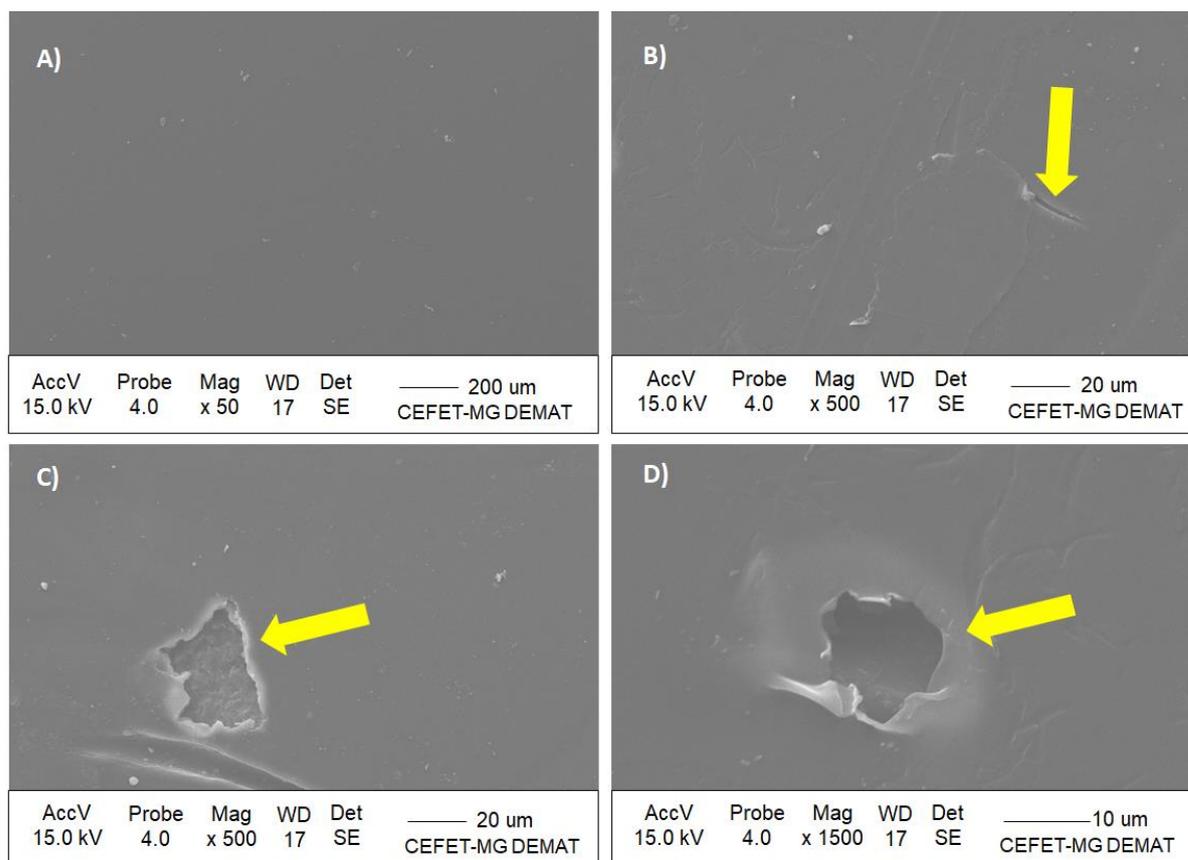
Figura 26 – Filme de PU_{óleo} irradiado com 10 KGy.



Fonte: Próprio Autor.

As imagens de microscopia do filme de PU_{óleo} irradiado com 15 KGy são apresentadas na figura 27. De maneira geral, a superfície foi visualmente semelhante às outras de PU_{óleo}. Porém, ao contrário do observado na microscopia eletrônica da amostra de PU₀ irradiada com 15 KGy, o filme de PU_{óleo} irradiado com esta dose de radiação gama apresentou nítidos sinais de alterações superficiais, indicativos de degradação da superfície do filme (setas - painéis B, C e D).

Figura 27 – Filme de PU_{óleo} irradiado com 15 KGy.



Fonte: Próprio Autor.

Os resultados obtidos sugerem que a adição do óleo de copaíba reduziu a tolerabilidade dos filmes de PU à radiação gama. De acordo com a metodologia de preparação dos filmes de PU_{óleo}, o óleo de copaíba é incorporado à estrutura polimérica após a evaporação do solvente, possivelmente aumentando o volume livre entre as cadeias, como observado por Deng *et al.* (2018). Desta forma, pode-se pensar que este fenômeno pode alterar a capacidade de absorção de radiação pelo polímero, levando à quebra de cadeias, e consequente geração de radicais livres.

Além disso, a estabilidade físico-química do óleo de copaíba deve ser também estudada, de forma separada, para garantir-se que os sinais de degradação superficial não se devam à degradação do óleo em si.

As evidências apresentadas pelas imagens de microscopia eletrônica da amostra de PU_{óleo} permitem inferir que, após a adição de óleo de copaíba, os filmes de PU não suportam mais radiação gama em dose de 15 KGy nas condições analisadas e, por isso, a dose máxima de radiação gama na qual as amostras de PU_{óleo} podem ser expostas neste trabalho é de 10 KGy.

Os filmes de PU com e sem óleo de copaíba produzidos pelo método de evaporação de solvente apresentaram superfícies similares, a partir da observação realizada como o auxílio de microscópio eletrônico de varredura. Suas superfícies se apresentaram, de maneira geral, homogêneas e contínuas, sem a presença de poros abertos, e apresentando certas proeminências, provavelmente devido à pequenos fragmentos de polímero não completamente dissolvidos durante o processo de produção dos filmes. As doses 15 KGy e 10 KGy não mostraram diferenças superficiais significativas nos filmes de PU₀ e PU_{óleo}, respectivamente; no entanto, a literatura aponta que a radiação gama pode gerar alterações nas propriedades físico-químicas de materiais poliméricos (DAVISON *et al.*, 2018) e, por isso, outras análises, como ensaios de tração, análise termogravimétrica (TG), calorimetria diferencial de varredura (DSC), devem ser realizadas futuramente para assegurar que os filmes suportam as doses de radiação gama utilizadas. Adicionalmente, é discutido na literatura que a realização do processo de irradiação mantendo-se as amostras em temperaturas muito baixas, ou ambientes com ausência de oxigênio podem garantir ao material estabilidade química em doses superiores de radiação gama (DAVISON *et al.*, 2018), o que pode ser uma boa maneira de se irradiar os polímeros, em uma tentativa de evitar degradação polimérica.

Para os ensaios de viabilidade celular cujos resultados são apresentados a seguir, foram escolhidas as doses de radiação gama dos filmes de 15 e 10 KGy para as amostras de PU₀ e PU_{óleo}, respectivamente.

5.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A biocompatibilidade dos filmes de poliuretano foi verificada a partir de ensaios de viabilidade celular utilizando células HaCaT em dois delineamentos experimentais distintos. No primeiro delineamento, discos PU₀ de 15 mm de diâmetro foram posicionados em placas de 24 poços, e em seguida as células HaCaT foram adicionadas; neste ensaio foi avaliada a viabilidade e a adesão celular. No segundo delineamento, células foram adicionadas em placas de 6 poços e em seguida discos PU₀ de 10 mm de diâmetro foram colocados sobre as células; neste ensaio foi avaliada a viabilidade celular por contato direto.

Avaliação da viabilidade e adesão celular em filmes de PU₀

As figuras 28 e 29 a seguir apresentam os resultados do ensaio de viabilidade celular com células HaCaT, após contato com amostras de PU₀, realizado na placa de 24 poços. A avaliação quantitativa da viabilidade celular foi realizada a partir do ensaio de Alamar Blue. A figura 28

apresenta a placa de 24 poços após o tratamento por 3h com o reagente Alamar Blue. As duas primeiras colunas da placa apresentam poços sem adição de células, utilizados como branco do experimento, e a terceira e quarta colunas, poços com células. É possível observar a reação de redução da resazurina à resorufina em todos os poços contendo células, a partir da coloração rosa do meio; observa-se também que os poços sem células (colunas 1 e 2 da placa) não sofreram tal reação, e por isso sua coloração é lilás.

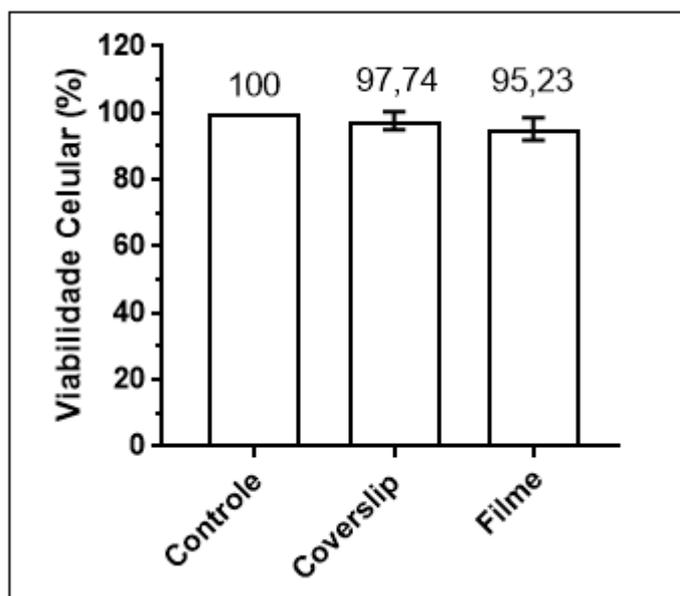
Figura 28 - Placa de 24 poços após incubação por 3h com reagente Alamar Blue.



Cél = células; CS = *coverslip*; X = poços vazios.

Fonte: Próprio autor.

A análise quantitativa do ensaio encontra-se apresentada na figura 29. De acordo com o desenho do ensaio, o percentual de células viáveis foi obtido considerando-se o controle (células sem tratamento) como 100% de viabilidade.

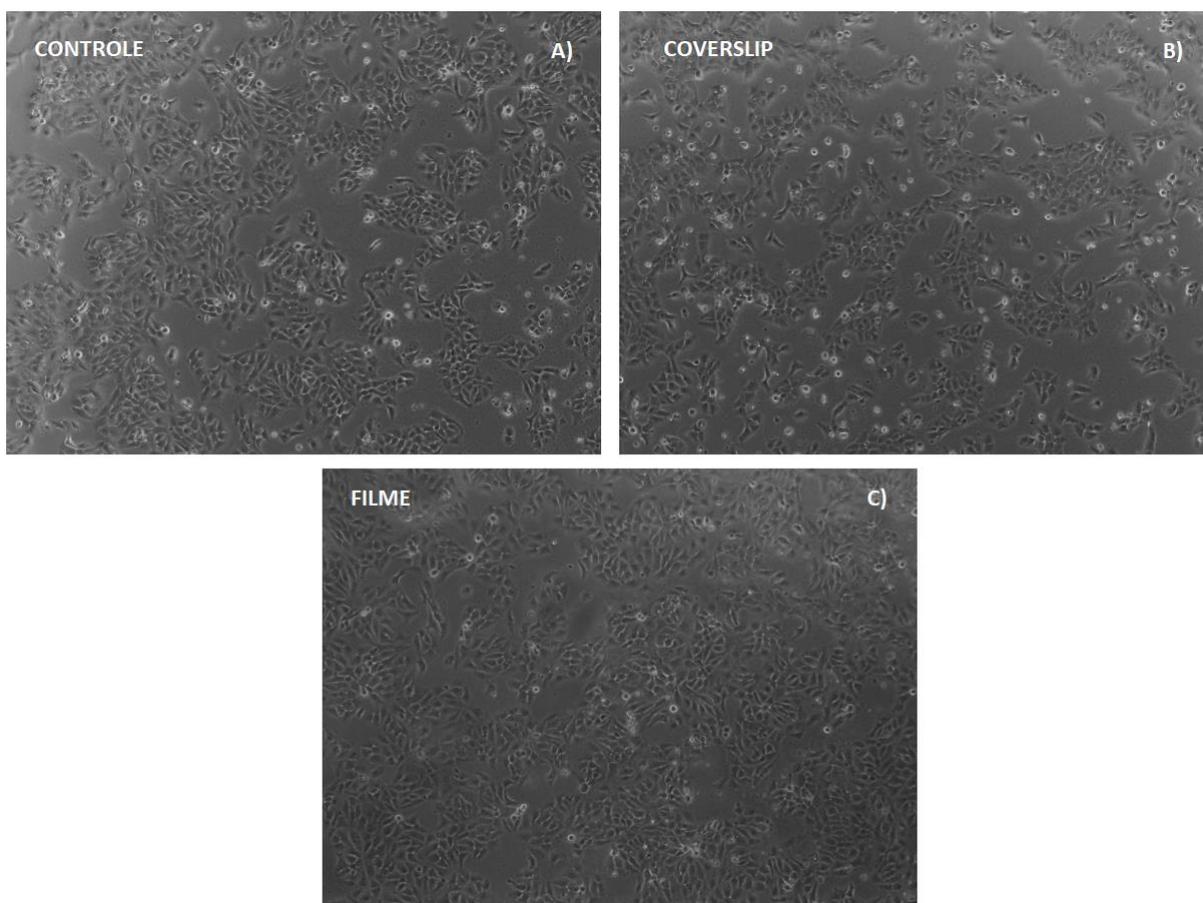
Figura 29 - Viabilidade de células HaCaT em placas de 24 poços.

Fonte: Próprio autor.

O percentual médio de células vivas nos poços contendo *coverslip* foi de 97,74% ($\pm 4,06$); para os poços contendo filme de PU₀ esse valor foi de 95,22% ($\pm 2,40$); esses valores representam a média de três ensaios independentes. Os resultados de viabilidade celular de células HaCaT em contato com filme de PU₀ não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle ($p = 0,91$) ou ao grupo de *coverslip* ($p = 0,98$), de acordo com teste de Tukey de comparações múltiplas. Também não foi observada diferença estatística entre os resultados de viabilidade do grupo controle em relação ao grupo de *coverslip* ($p = 0,99$). Desta forma, a partir deste ensaio, pode-se inferir que os filmes de PU₀ não são citotóxicos para os queratinócitos nas condições experimentais testadas.

A figura 30 apresenta imagens obtidas por microscopia óptica com ampliação de 10x das células HaCaT após 24 h de ensaio. Os painéis A, B e C representam, respectivamente, os poços controle, *coverslip* e filme. Os poços apresentaram distribuição de células homogênea, no geral, mas uma maior densidade celular foi observada no centro dos poços. A morfologia celular em todos os poços é semelhante, condizente com a morfologia já observada para essas células (BOUKAMP *et al.*, 1988).

Figura 30 – Microscopia óptica de células HaCaT em placas de 24 poços.



Fonte: Próprio autor.

Neste ensaio, foi proposto avaliar, além do potencial citotóxico dos filmes, o potencial de adesão celular à superfície das amostras de PU₀, devidamente posicionadas no fundo dos poços, anteriormente à adição de células. A partir dos resultados observados por microscopia óptica, bem como a partir dos dados quantitativos, é possível inferir que as células HaCaT têm boa capacidade de adesão à superfície dos filmes de PU₀.

A princípio, pode não ser interessante a adesão de células HaCaT à superfície do material, pois, filmes curativos devem ser trocados periodicamente, e esse procedimento pode ocasionar mais lesão à medida que arranca células aderidas. Entretanto, no delineamento adotado as células adicionadas estavam em suspensão, e após 24 horas foi observada adesão celular à superfície do material. Esse resultado não indica necessariamente que o material produzido em contato com feridas da pele será uma superfície propensa à adesão de células que estão conectadas, formando tecidos. Desta forma, estudos adicionais em modelos animais são requeridos para avaliar o comportamento do material em organismos vivos.

Ensaio de viabilidade celular com filmes de PU₀ por contato direto

No intuito de complementar os resultados obtidos, um ensaio de viabilidade celular foi realizado na placa de 6 poços. Neste ensaio, as células foram adicionadas antes dos filmes e *coverslips*, e apenas após os poços atingirem cerca de 80% de confluência celular, as amostras foram adicionadas. Desta forma, garante-se que as células já estejam aderidas aos poços no momento do contato direto, e variáveis adicionais, como taxas de adesão das células aos diferentes materiais são eliminados. Para este ensaio, seguiu-se às orientações da norma internacional ISO 10993 (*Biological evaluation of medical devices*), garantindo-se um tamanho de amostra com área de aproximadamente 1/10 da área do poço.

Seguindo o mesmo delineamento do ensaio anterior, o poço contendo células sem nenhum tratamento foi considerado como 100% de viabilidade, e um poço sem células foi utilizado como branco. As *coverslips* foram novamente adicionadas como controle. A figura 31 apresenta parte da placa de 6 poços após o tratamento por 3h com o reagente Alamar Blue. Os poços contendo células sofreram alteração na coloração do meio, de lilás para rosa, devido à reação de redução da resazurina à resorufina; e o poço sem células não sofreu tal reação, mantendo a coloração lilás.

Figura 31 - Placa de 6 poços após incubação por 3h com reagente Alamar Blue.

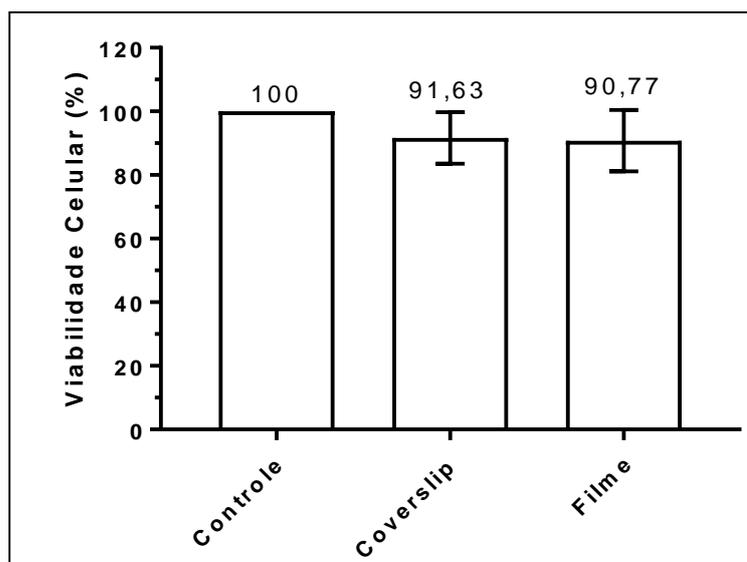


Fonte: Próprio autor.

A análise quantitativa do ensaio encontra-se apresentada na figura 32. O percentual médio de células vivas no poço contendo *coverslip* foi de 91,63% ($\pm 6,62$); e para o poço contendo filme de PU₀, esse valor foi de 90,78% ($\pm 7,88$); esses resultados representam a média de três

ensaios independentes. Os resultados de viabilidade de células tratadas com filme de PU₀ não apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao grupo controle ($p = 0,19$) ou ao grupo de *coverslip* ($p = 9780$), de acordo com teste de Tukey de comparações múltiplas.

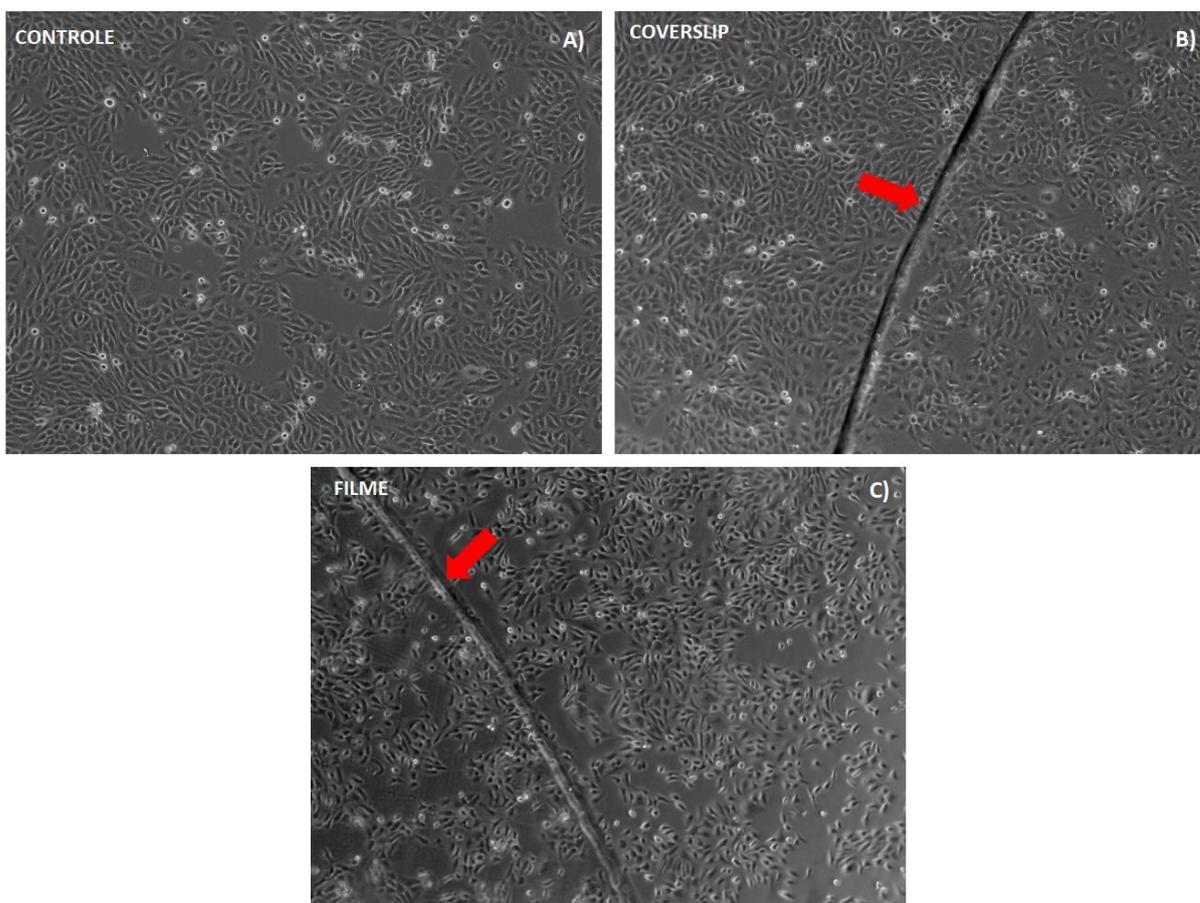
Figura 32 - Viabilidade de células HaCaT em placas de 6 poços.



Fonte: Próprio autor.

A figura 33 apresenta imagens obtidas por microscopia óptica das células HaCaT após 24 h em contato direto. O painel A apresenta poço contendo apenas células, o painel B, o poço contendo *coverslip*, e o painel C, o poço contendo filme. As imagens se encontram em ampliação de 10x. As setas indicam as extremidades da *coverslip* (painel B) e do filme (painel C). De forma similar ao ensaio anterior, os poços apresentaram distribuição de células homogênea; porém, como a duração deste ensaio foi maior (24 h de contato direto após células atingirem confluência de ~80%), houve menor fração de locais vazios. A morfologia celular em todos os poços é semelhante entre si, e a das imagens obtidas do experimento anterior.

Figura 33 - Microscopia óptica de células HaCaT em placas de 6 poços.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados apresentados sugerem que filmes de PU₀ obtidos a partir de *pellets* de PU DELTHANE® E85, nas condições experimentais testadas apresentam citocompatibilidade em relação a células HaCaT, reforçando a possível aplicação desse material como curativo, de forma a auxiliar a promoção de um ambiente propício ao crescimento e proliferação celular no local de uma lesão cutânea. Sabe-se também que a biocompatibilidade de biomateriais a base de poliuretano é amplamente descrita em outros estudos *in vitro*. Por exemplo, Rezapour-Lactoe *et al.* (2016) produziram membranas termossensíveis de poliuretano/siloxano para potencial aplicação como curativos. A biocompatibilidade das membranas foi avaliada a partir de ensaio por extrato; após 7 dias de imersão de amostras em meio de cultura, o meio foi colocado em contato com a linhagem de fibroblastos. A viabilidade celular foi avaliada a partir de ensaio por MTT, um ensaio quantitativo similar ao Alamar Blue, e nenhum potencial citotóxico foi observado.

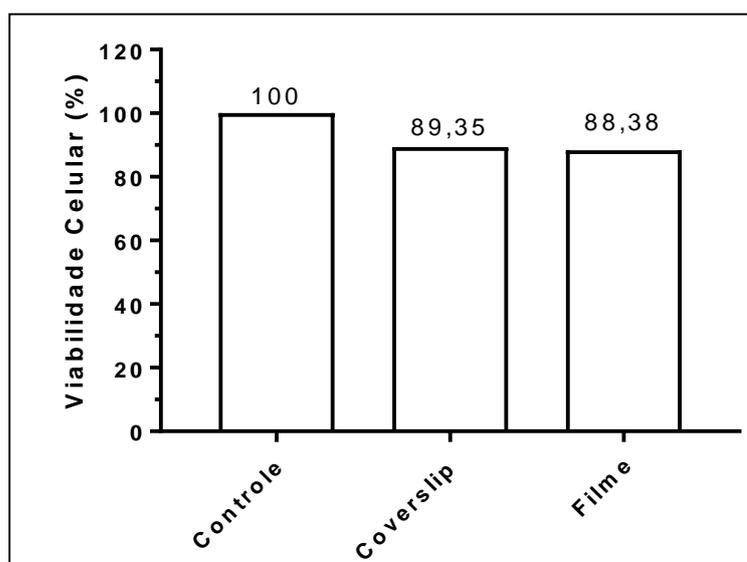
Sahraro *et al.* (2016) produziram membranas de poliuretanos com cloridrato de guanidina, substância com conhecido potencial antimicrobiano, para aplicação como curativos.

Avaliou-se a biocompatibilidade *in vitro* do material a partir de ensaio por contato direto e por extrato, com uma linhagem de fibroblastos. A viabilidade celular foi avaliada de maneira quantitativa a partir de ensaio por MTT, e pôde-se concluir que as membranas apresentaram citocompatibilidade em relação aos fibroblastos. Diversos estudos na literatura, para avaliação de biomateriais candidatos à aplicação como curativos, adicionam diferentes compostos em matrizes poliméricas no intuito de agregar propriedades aos materiais, como por exemplo, propriedades antimicrobianas. Nesse sentido, filmes de PU com óleo de copaíba, foram produzidos e a biocompatibilidade avaliada utilizando ensaios *in vitro* com células HaCaT.

Ensaio preliminar de viabilidade celular com filmes de PU_{óleo} por contato direto

Foi realizado um ensaio preliminar de viabilidade celular em placa de cultura de 6 poços com amostra de PU_{óleo}, utilizando o mesmo delineamento experimental do ensaio com PU₀ na placa de 6 poços. O resultado quantitativo do ensaio é apresentado na figura 34. O percentual de células vivas no poço contendo *coverslip* foi de 89,35%; e para o poço contendo filme, esse valor foi de 88,38%. Mais ensaios devem ser realizados, mas, a princípio, há um indicativo de que o óleo de copaíba, quando incorporado a filmes de PU, não apresenta potencial citotóxico para as células HaCaT nas condições experimentais avaliadas.

Figura 34 - Viabilidade de células HaCaT em contato direto com PU_{óleo}.



Fonte: Próprio autor.

A biocompatibilidade do óleo de copaíba é corroborada na literatura, em ensaios de viabilidade celular realizados com células HaCaT. Venturini *et al.* (2015) produziram nanopartículas para encapsulação de óleo de copaíba, para potencial uso no tratamento de carcinomas de pele. Ensaios *in vitro* mostraram que o óleo é liberado no meio, e testes de contato direto por 12 horas com células HaCaT indicam que as nanopartículas não apresentaram efeito citotóxico, mostrando que o óleo de copaíba não causa danos a essa linhagem de células.

Observa-se uma tendência pela busca de curativos com propriedades antimicrobianas, principalmente no que se trata de feridas crônicas, sujeitas a complicações geradas por infecções, o que pode potencializar a inflamação já existente (MULHOLLAND *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2013). Materiais poliméricos estão sujeitos a contaminação microbiana, devido a características superficiais, tais como grupos funcionais de superfície, rugosidade superficial, hidrofobicidade, carga e porosidade; e essas características podem levar a adsorção de bactérias à superfície polimérica, gerando proliferação microbiana. Esses eventos podem ocasionar uma infecção microbiana, colocando em risco a saúde do paciente, e gerando a necessidade de remoção do dispositivo em questão (SANTOS *et al.*, 2018). Desta forma, a busca por substâncias com ação antimicrobiana a serem incorporadas em curativos de pele é de relevância médica, de maneira a evitar ao máximo o aparecimento de infecções nos locais lesionados.

5.5. ENSAIOS DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

A avaliação das propriedades antimicrobianas do óleo de copaíba foi feita a partir do ensaio de disco-difusão em ágar utilizando a bactéria *Bacillus subtilis*. Na figura 35 observa-se que discos de papel embebidos em três óleos de copaíba diferentes formam um discreto halo de inibição para o crescimento bacteriano. O disco na posição superior e indicado pela seta contém o óleo de copaíba utilizado para a produção dos filmes no presente trabalho.

Figura 35 – Ensaio de disco-difusão do óleo de copaíba em ágar



Fonte: Próprio autor.

Propriedades antimicrobianas do óleo de copaíba são amplamente descritas na literatura (CASCON & GILBERT, 2000; LAMA *et al.*, 2014, MORELLI *et al.*, 2015; BONAN *et al.* 2015), entretanto, inúmeras variáveis, como espécie de copaíba utilizada, época de extração do óleo, microrganismo testado, dentre outras, podem influenciar na atividade antimicrobiana. No presente trabalho, o teste de disco-difusão foi realizado com bactérias recém descongeladas, e que, portanto, apresentavam pequena taxa metabólica. Em ensaios posteriores realizados nas mesmas condições, mas com bactérias mantidas em cultura líquida não foi possível observar a formação do halo (dados não mostrados). Curiosamente, análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas realizadas indicam que o óleo utilizado no presente trabalho é constituído por mais de 40 % de β -cariofileno, um composto amplamente associado à atividade antimicrobiana (MARANGON *et al.*, 2017; MORELLI *et al.*, 2015; BONAN *et al.* 2015) (Anexo 1). Desta forma, estudos adicionais devem ser realizados para confirmar a existência de propriedades antimicrobianas no óleo de copaíba utilizado.

Além disso, a atividade antimicrobiana dos filmes, bem como a avaliação mais precisa do potencial citotóxico do óleo de copaíba, estão altamente ligadas à capacidade de liberação do óleo presente na estrutura. Desta forma, a condução de ensaios de liberação controlada é de relevância para estudos futuros, de forma a ser possível relacionar a quantidade de óleo de

copaíba liberada, e o efeito *in vitro*, tanto no que diz respeito à sua atividade antimicrobiana, quanto à sua biocompatibilidade, em diferentes períodos de tempo.

6. CONCLUSÃO

A técnica de evaporação de solvente com DMF demonstrou ser um processamento eficiente para a produção de filmes transparentes de poliuretano com e sem óleo de copaíba; tendo os filmes aspecto liso, fino e homogêneo. A dose mínima de radiação gama necessária para promover a esterilização dos filmes de PU₀ é de 10 KGy. Já nas doses de 20 e 15 KGy foram observados indícios de degradação polimérica para filmes de PU₀ e de PU_{óleo}, respectivamente, a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura. Ensaio *in vitro* com a linhagem celular de queratinócitos HaCaT indicam a citocompatibilidade dos filmes de PU₀. Um ensaio preliminar de viabilidade celular com amostras de PU_{óleo} sugere que este material também apresenta citocompatibilidade com células HaCaT. Em suma, os resultados obtidos neste trabalho indicam que filmes de poliuretano com e sem óleo de copaíba apresentam citocompatibilidade em células de linhagem de queratinócitos HaCaT, com um baixo índice de morte celular, e sem evidências de reações promotoras de citotoxicidade, sugerindo que este é um material promissor para utilização como curativos de pele com possível atividade antimicrobiana.

7. PERSPECTIVAS

A incorporação do óleo de copaíba a filmes de poliuretano é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de curativos a serem aplicados no tratamento de feridas. No entanto, é necessário confirmar a partir de outras técnicas de caracterização físico-química dos filmes de PU que as doses de irradiação gama escolhidas não induzem a degradação polimérica. Além disso, deve-se avaliar isoladamente como a irradiação gama pode afetar as propriedades biológicas do óleo de copaíba. A determinação do perfil de liberação do óleo de copaíba incorporado nos filmes de PU é uma característica importante a ser determinada, pois está intimamente associada à biocompatibilidade dos filmes e ao potencial antimicrobiano do óleo de copaíba. Estudos adicionais também devem ser realizados para definir as propriedades antimicrobianas do óleo de copaíba utilizado no presente trabalho, como por exemplo, avaliação em separado dos princípios ativos do óleo e testes com outras espécies de bactérias. Finalmente, estudos *in vivo* devem ser realizados para uma avaliação e acompanhamento mais direcionados do processo de cicatrização de feridas recobertas com o material proposto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTER, N.; KHAN, R. A.; SALMIERI, S.; SHARMIN, N.; DUSSAULT, D.; LACROIX, M. **Fabrication and mechanical characterization of biodegradable and synthetic polymeric films: Effect of gamma radiation.** Radiation Physics and Chemistry, v. 81, n. 8, ago. 2012, pp. 995-998.

ALMEIDA, C.; L.; GONÇALVES, D.; PINTO, M. R.; AKCELRUD, L. **Síntese e caracterização de poliuretanos segmentados contendo blocos de peso molecular controlado. Parte 2: correlações entre morfologia e comportamentos térmico e mecânico.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 10, n. 4, pp. 193-201, 2000.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) por CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **M2-A7: Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão – Norma aprovada, 8a edição.**

BARRIONI, B. R.; CARVALHO, S. M.; ORÉFICIE, R. L.; OLIVEIRA, A. A. R.; PEREIRA, M. M. **Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolysable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications.** Materials Science and Engineering C, v. 52, jul. 2015, pp. 22-30.

BAUME, A. S.; BOUGHTON, P. C.; COLEMAN, N. V.; RUYS, A. J. **Sterilization of tissue scaffolds.** Characterisation and Design of Tissue Scaffolds, 2016, pp. 225-244.

BOATENG, J. S.; PAWAR, H. V.; TETTEH, J. **Polyox and carrageenan based composite film dressing containing anti-microbial and anti-inflammatory drugs for effective wound healing.** International Journal of Pharmaceutics, v. 441, n. 1-2, jan. 2013, pp 181-191.

BONAN, R. F.; BONAN, P. R. F.; BATISTA, A. U. D.; SAMPAIO, F. C.; ALBUQUERQUE, ALLAN J. R.; MORAES, M. C. B.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G. M.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E. **In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with copaíba (copaifera sp.) oil.** Materials Science and Engineering: C, v. 48, mar. 2015, pp. 372-377.

BORELLI, V.; MEDEIROS, F.; MAIA, M.; MEDEIROS, R.; HIGA, O. Z. **Biocompatibilidade de biomateriais: estudo exploratório sobre a aplicação da norma ISO 10.993.** COLAOB – Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2010.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNUNG, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N. E. **Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.** The Journal of Cell Biology, v. 106, mar. 1988, pp. 761-771.

BURILLO, G.; BERISTAIN, M. F.; SANCHEZ, E.; OGAWA, T. **Effects of aromatic diacetylenes on polyurethane degradation by gamma irradiation.** Polymer Degradation and Stability, v. 98, n. 10, out. 2013, pp. 1988-1992.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros – um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2^a ed. São Carlos: Artliber Editora Ltda, 2006.

CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; JESUS, A. C.; CARVAALHO, S. M.; OLIVEIRA, L. C.; MANSUR, H. S. **Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PWG hydrogels for potential wound dressing applications**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 106, jan. 2017, pp. 1218-1234.

CARVALHO, T. C. **Biotransformações dos terpenos β -cariofileno e ácido 3 β -acetóxi-copálico presentes em oleorresinas de copaifera sp utilizando fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos**. 2016, 46 f. (Tese) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

CASCON, V.; GILBERT, B. **Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne**. Phytochemistry 55, p. 773-778, 2000.

CHERNG, J. Y.; HOU, T. Y.; SHIH, M. F.; TALSMA, H.; HENNINK, W. E. **Polyurethane-based drug delivery systems**. International Journal of Pharmaceutics, v. 450, n. 1-2, jun. 2013, pp. 145-162.

CHIAVERINI, V. **Aços e ferros fundidos**. 6^a ed. São Paulo: Associação Brasileira de Metalurgia, 1990.

CHIONO, V.; SARTORI, S.; CALZONE, S.; BOFFITO, M.; TONDA-TURO, C.; MATTU, C.; GENTILE, P.; CIARDELLI, G. **Synthetic biodegradable medical polyurethanes**. Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers – Materials and Properties, 2017, pp. 189-216.

COSTA, C. Z.; ALBUQUERQUE, M. C. C.; BRUM, M. C.; CASTRO, A. M. **Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão**. Quim. Nova, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 259-267, fev. 2015.

CUI, Y.; NA, Y.; JIN, T.; ZHANG, F.; HE, P. **Real-time monitoring of skin wound healing on nano-grooves topography using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 250, out. 2017, pp. 461-468.

CURATEC © - Cuidado que cura. 2017 Direitos reservados a Curatec.

DAVISON, L.; THEMISTOU, E.; BUCHANAN, F.; CUNNINGHAM, E. **Low temperature gamma sterilization of a bioresorbable polymer, PLGA**. Radiation Physics and Chemistry, v. 143, fev. 2018, pp. 27-32.

DENG, L.; KANG, X.; LIU, Y.; FENG, F.; ZHANG, H. **Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting**. Food Hydrocolloids, v. 74, jan 2018, pp. 324-332.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. School of Pharmaceutical Sciences, University of Nottingham, UK, 2002.

Dreamstime. **Inflammation and tissue repair.** Disponível em: <<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-inflammation-tissue-repair-chemical-cellular-factors-involved-inflammatory-response-to-damage-created-adobe-image62002173>>. Acesso em: 30 mai. 2018.

ECHER, I. C.; SANTOS, J. B. dos; PORTO, S. G.; SUZUKI, L. M.; SOSTIZZO, L. R. Z.; ANTONIAZZI, J. L. **Avaliação e tratamento de feridas: orientações aos profissionais de saúde.** Porto Alegre: Hospital de Clínicas, 2010, 44p.

ESTEVIÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; EVÊNCIO, L. B.; SIMÕES, R. S.; MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J. **Effects of the topical administration of copaíba ointment (*copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability for rats.** Acta Cirurgica Brasileira, v. 28, 2013, pp. 863-869.

FERREIRA, H.; MATAMÁ, T.; SILVA, R.; SILVA, C.; GOMES, A. C.; CAVACO-PAULO, A. **Functionalization of gauzes with liposomes entrapping an anti-inflammatory drug: a strategy to improve wound healing.** Reactive and Functional Polymers, v. 73, n. 10, out. 2013, pp. 1328-1334.

FIORIO, R.; PISTOR, V.; BOLNER, A. S.; ZATTERA, A. J.; PETZOLD, C. L. **Caracterização térmica de poliuretano termoplástico (TPU) sintetizado por extrusão reativa. 1. Influência do teor de POSS.** 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR, out. 2009.

GAO, X.; ZHANG, X.; WANG, Y.; FAN, C. **Effects of morphology and surface hydroxyl on the toxicity of BiOCl in human HaCaT cells.** Chemosphere, v. 163, nov. 2016, pp. 438-445.

GANESAN, P. **Natural and bio polymer curative films for wound dressing medical applications.** Wound Medicine, v. 18, set 2017, pp 33-40.

GARCÍA, M. G.; ALDANA, A. A.; TÁRTARA, L. I.; ALOVERO, F.; STRUMIA, M. C.; MANZO, R. H.; MARTINELLI, M.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. F. **Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin.** Carbohydrate Polymers, v. 175, nov. 2017, pp 75-86.

GASTON, F.; DUPUY, N.; MARQUE, S. R. A.; DOREY, S. **Evaluation of multilayer film stability by Raman spectroscopy after gamma-irradiation sterilization process.** Vibrational Spectroscopy, v. 96, mai. 2018, pp. 52-59.

GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S. **The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications.** Polymer Degradation and Stability, v. 79, n. 3, mar. 2003, pp. 456-474.

GRACIOLI, E. L. C. **Desenvolvimento de membranas de poliuretano com rapamicina e seu potencial uso em regeneração vascular.** 2016, 111f. (Tese). Faculdade de Engenharia. Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUC-RS.

HARTMANN © - Mais pela saúde. 2016 PAUL HARTMANN LDA.

HOWARD, G. T. **Biodegradation of polyurethane: a review.** Int Biodeter 2002; p.49:245–52.

ISO 10993-5, **Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity.** 3^a ed., jun. 2009.

JANIK, H.; MARZEC, M. **A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds.** Materials Science and Engineering C, v. 48, dec. 2015, pp. 586-591.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 12^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

JURÁNOVÁ, J.; FRANKOVÁ, J.; ULRICHOVÁ, J. **The role of keratinocytes in inflammation.** Journal of Applied Biomedicine, v. 15, n. 3, jul. 2017, pp. 169-179.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. S.; CHEN, X. **A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings.** Journal of Advanced Research, v. 8 n. 3, mai. 2017, pp 217-233.

KOBIELA, T.; KRAWCZYK, M. M.; LUKOWSKA, E.; DOBRZYNSKI, P.; PASTUSIAK, M.; DMOCHOWSKA, A. S.; LUKES, J.; WESOŁOWSKA, K. B.; CHWOJNOWSKI, A. **The effect of polymeric membrane surface on HaCaT cell.** Micron, v. 101, out. 2017, pp. 162-169.

LAMA, R.; ZHONG, B.; KULMAN, D. G.; SU, B. **Bioassay guided identification of small chaperone proteins α -crystallin and Hsp27 inhibitors from Copaiba oil.** Phytochemistry Letters 10, p. 65–75, 2014.

LEONES, R.; SABADINI, R. C.; SENTANIN, F. C.; ESPERANÇA, J. M.; PAWLICKA, A.; SILVA, M. M. **Polymer electrolytes for electrochromic devices through solvent casting and sol-gel routes.** Solar Energy Materials and Solar Cells, v. 169, set 2017, pp. 98-106.

LI, K.; ZHOU, R.; JIA, W. W.; LI, Z.; LI, J.; ZHANG, P.; XIAO, T. **Zanthoxylum bungeanum essential oil induces apoptosis of HaCaT human keratinocytes.** Journal of Ethnopharmacology, v. 186, jun. 2016, pp. 351-361.

LI, S.; LI, L.; GUO, C.; QIN, H.; YU, X. **A promising wound dressing material with excellent cytocompatibility and proangiogenesis action for wound healing: strontium loaded silk fibroin/sodium alginate (SF/SF) blend films.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 104, parte A, nov. 2017, pp. 969-978.

LIMA JUNIOR, J. E.; FERREIRA, M. C.; ALESSI, M. S.; NAKAMOTO, H.; TUMA JUNIOR, P. **Estudo comparativo entre filme transparente de poliuretano e curativo de rayon para cobertura de área doadora de enxertos de pele parcial.** Revista Brasileira de Cirurgia Plástica, v. 24, n. 4, 2009.

LOSQUADRO, W. D. **Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer.** Facial Plastic Surgery Clinics of North America, v. 25, n. 3, ago. 2017, pp 283-289.

LV, F.; WANG, J.; XU, P.; HAN, Y.; MA, H.; XU, H.; CHEN, S.; CHANG, J.; KE, Q.; LIU, M.; YI, Z.; WU, C. **A conductive bioceramic/polymer composite biomaterial for diabetic wound healing.** *Acta Biomaterialia*, v. 60, set. 2017, pp. 128-143.

MACHADO, R. R. L. **Produção e caracterização de filme de poliuretano termoplástico com óleo de copaíba para potencial aplicação como curativos.** (Dissertação), 2017, 98 f., Departamento de Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG.

MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; LEITE, P. M. F.; SANTOS, D. A.; NITSCHKE, M.; PLEPIS, A. M. G. **Chitosan/gelatina/copaíba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria.** *Industrial Crops and Products*, v. 99, mai. 2017, pp. 163-171.

MARZEC, M.; LIPKA, J. K.; KALASZCZYNSKA, I.; JANIK, H. **Development of polyurethanes for bone repair.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 80, nov. 2017, pp. 736-747.

MASIUK, S.; RAKOCZY, R. **Following of polymerization process of polyurethane spinning solutions in dimethylformamide by means of the power consumption.** *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, n. 1, jan, 2009, pp. 538-548.

MORELLI, C. L. *et al.* **Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging.** *Industrial Crops and Products* 70, p. 134–141, 2015.

MULHOLLAND, E. J.; DUNNE, N; MCCARTHY, H. O. **MicroRNA as Therapeutic targets for chronic wound healing.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 8, set. 2017, pp. 46-55.

MURPHREE, R. W. **Impairments in skin integrity.** *Nursing Clinics of North America*, Atlanta, v. 52, n. 3, set. 2017, pp. 405-417.

MUSSEL, V. A. F. S. N.; FERREIRA, M. P.; MARQUES, M. B. F.; YOSHIDA, M. I.; ALMEIDA, M. R.; RODRIGUES, B. L.; MUSSEL, W. N. **Physics, chemistry, and Hirshfeld surface analyses of gamma-irradiated thalidomide to evaluate behavior under sterilization doses.** *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 24 mai. 2018.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. **Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro.** *Journal of Immunological Methods*, v. 204, n. 2, mai. 1997, pp. 205-208.

NATARAJAN, V. T.; GANJU P.; RAMUKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R. S. **Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation.** *Nature Chemical Biology*, v. 10, jun. 2017, pp. 542-551.

NATU, M. V.; SOUSA, H. C.; GIL, M. H. **Influence of polymer processing technique on long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) constructs.** *Polymer Degradation and Stability*, v. 98, n. 1, jan. 2013, pp. 44-51.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. **Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development.** *Expert Opinion Drug Discovery*, v. 6, n. 3, 2008, pp. 655-669.

OZSAGIROGLU, E. IYISAN, B.; AVCIBASI, Y.; GUVENIRH, A. **Biodegradation and characterization studies of different kinds of polyurethane with several enzyme solutions.** Polish Journal of Environmental Sciences, Vol. 21, No. 6, p. 1777-1782, 2012.

PASCOAL, D. R. C.; ALBUQUERQUE, E. C. M. C.; VELOZO, E. S.; SOUSA, H. C.; MELO, S. A. B. V.; BRAGA, M. E. M. N. **Copaiba oil-loaded comercial wound dressings using supercritical CO₂: a potential alternative topical antileishmanial treatment.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 129, nov. 2017, pp. 106-115.

Poliuretano termoplástico delthane® - folha de dados. Delmac do Brasil LTDA, Guarulhos - São Paulo, mar. 2013.

PORTO, K. M. B. G.; NAPOLITANO, C. M.; BORRELY, S. I. **Gamma radiation effects in packaging for sterilization of health products and their constituents paper and plastic film.** Radiation Physics and Chemistry, v. 142, jan. 2018, pp. 23-28.

RAMPERSAD, S. N. **Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays.** Sensors, v. 12, set. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3478843/pdf/sensors-12-12347.pdf>>. Acesso em 25 ou. 2017.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.** Elsevier Academic Press, 2^a ed., 2004, 851 pp.

REZAPOUR-LACTOEE, A.; YEGANEH, H.; OSTAD, S. N.; GHARIBI, R.; MAZAHARI, Z.; AI, J. **Thermoresponsive polyurethane/siloxane membrane for wound dressing and cell sheet transplantation: in-vitro and in-vivo studies.** Materials Science and Engineering: c, v. 69, dez. 2016, pp.804-814.

SAHRARO, M.; YEGANEH, H.; SORAYYA, M. **Guanidine hydrochloride embedded polyurethanes as antimicrobial and absorptive wound dressing membranes with promising cytocompatibility.** Materials Science and Engineering: c, v. 59, fev. 2016, pp. 1025-1037.

SÁNCHEZ, J. B. **Efeitos da articaína associada a 2hidroxipropil-β-ciclodextrina ou epinefrina sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT).** (Dissertação), 2014, 76 f. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

SANTOS, M. R.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; COSTA, M. M.; OLIVEIRA, H. P. **Usnic acid-loaded polyaniline/polyurethane foam wound dressing: preparation and bactericidal activity.** Materials Science and Engineering: c, v. 89, ago. 2018, pp. 33-40.

Shutterstock. **The layers of human skin.** Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/melanocyte-melanin-layers-epidermis-melanocytes-produce-174446576?src=PE6Mm91-L2zjVwOaFYa5dA-1-4>>. Acesso em: 30 mai. 2018.

SOLEY, B. S.; MORAIS, R. L. T.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. **Kinin receptors in skin wound healing.** Journal of Dermatological Science, v. 82, n. 2, mai. 2016, pp 95-105.

STODDART, M. J. **Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye - mammalian cell viability: methods and protocols.** Methods in Molecular Biology, Human Press, pp. 27-32, 2015.

TOBOUTI, P. L.; MARTINS, T. C. A.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. **Antimicrobial activity of copaiba oil: a review and a call for further research.** Biomedicine & Pharmacoteraphy, v. 94, 2017, pp. 93-99.

VEIGA JR., V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. **Phytochemical and antioedematogenix studies of comercial copaíba oils available in brazil.** Phytotherapy Research, v. 15, 2001, pp. 476-480.

VENTURINI, C. G.; BRUINSMANN, F. A.; CONTRI, R. V.; FONSECA, F. N.; FRANK, L. A.; D'AMORE, C. M.; RAFFIN, R. P.; BUFFON, A.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. **Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 79, nov. 2015, pp. 36-43.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. **Basic physiology of the skin.** Surgery (Oxford), Oxford, v. 35, n. 9, set. 2017. pp 473-526.

VILAR, W. **Química e tecnologia de poliuretanos.** 3º ed. Rio de Janeiro: Vilar Consultoria, 2004.

VINKLÁRKOVÁ, L.; MASTEIKOVÁ, R.; FOLTÝNOVÁ, G.; MUSELÍK, J.; PAVLOKOVÁ, S.; BERNATONIENE, J.; VETCHÝ, D. **Film wound dressing with local anesthetic based on insoluble carboxymethylcellulose matrix.** Journal of Applied Biomedicine, v. 15, n. 8, nov. 2017, pp. 313-320.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. **Wound dressings: principles and practice.** Surgery (Oxford), Oxford, v. 35 n. 9, set 2017, pp. 489-494.

WANG, J.; WINDBERGS, M. **Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 119, out. 2017, pp. 283-299.

ZULFAKAR, M. H.; ONG, C. M. Y.; HEARS, C. M. **The effects of betamethasone dipropionate and fish oil on HaCaT proliferation and apoptosis.** International Journal of Pharmaceutics, v. 434, n. 1-2, set. 2012, pp. 399-405.